



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Protección contra amibiasis hepática por inmunización en
mucosas con baculovirus recombinantes expresando la lectina de
unión a galactosa de *Entamoeba histolytica*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. C. DULCE MARÍA MENESES RUIZ

Tutor: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN

DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ

México, D. F. a junio de 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.

Agradecimientos

Al **Posgrado en Ciencias Biomédicas** de la UNAM.

Al programa de becas para estudios de doctorado del **CONACYT, becario/CVU: 204503**

Al financiamiento otorgado por los proyectos de **CONACYT-Grant 61111** y **DGAPA-IN-227707 e IN-213611-3**.

A los miembros del comité tutor:

✚ **Dr. Julio César Carrero Sánchez** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

✚ **Dr. Juan Pedro Laclette San Román** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

✚ **Dr. Luis Vaca Domínguez** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradecimientos personales

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser mi *alma mater* durante mi formación de bachillerato en la ENP plantel 4, profesional en la Facultad de Medicina y de posgrado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al **Dr. Julio César Carrero Sánchez** por la asesoría, el apoyo, y confianza que me brindó durante toda mi formación como investigadora.

Al **Dr. Juan Pedro Laclette** por permitirme ser parte de los estudiantes de su laboratorio y por su invaluable instrucción y apoyo a cada momento en mi estancia doctoral.

Al **Dr. José Hugo Aguilar Díaz** por su contribución en el desarrollo de diversas técnicas de este trabajo.

Al **Dr. Luis Vaca Domínguez** por la asesoría, colaboración y mano dura para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Raúl Bobes** por su asesoría y apoyo en todo momento.

A los miembros del jurado: **Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, Dra Yolanda López Vidal, Dr. Guillermo Pérez Ishiwara y al Dr. Luis Padilla Noriega** por el tiempo que dedicaron a revisar esta tesis y por sus valiosas aportaciones que permitieron enriquecer el manuscrito.

A la **Dra. Ana Flisser** por su apoyo e invaluable asesoría durante toda mi formación como doctora en ciencias.

A la **MVZ Georgina Díaz** por su asesoría en el manejo adecuado de animales de laboratorio y su gran apoyo para la realización de este proyecto.

Al biólogo **Mario Nequiz** por su asistencia en los cultivos de *Entamoeba histolytica*.

Al técnico de histología del edificio de Investigación del Hospital General de México, el señor **Pedro Balderas** por enseñarme el “arte” de hacer histología.

A la **cDra. Alicia Sampieri** por su apoyo y asistencia en diversas técnicas moleculares.

Al **Dr. Joselin Hernández** por su apoyo y asistencia en técnicas inmunológicas.

Al **Dr. Agustín Luz** por su asesoría durante la obtención de los baculovirus recombinantes.

A la **Dra. Rosario López** por haberme proporcionado anticuerpo anti-lectina de *Entamoeba histolytica*.

Dedicatoria

A mis padres **Esteban Meneses** y **Alicia Ruiz**, por ser mi ejemplo de amor, fortaleza, compromiso, conciencia, solidaridad, generosidad, nobleza y alegría en la vida. Los amo!!

A mi hermana **Martha**, por ser mi compañera, mejor amiga y cómplice en esta vida... a quien admiro a cada momento y valoro cada palabra que tiene para mí. Ámote. P.D. Estás invitada a todas mis fiestas!

A mi hermana **Gaby**, por ser la absoluta responsable de mi primer acercamiento a la ciencia y también mejor amiga. A **Carlos, Lucas y mi ahijada Lisa May**, por ser una familia ejemplar y tener siempre puesta la camiseta de la familia.

A mis hermanos **Claudia y Esteban**, y sus hermosas familias: **Eduardo, Marifer y Daniela Silverio, Bárbara Ortíz, Diego e Ian Meneses**, en especial a mis sobrinos por ser los personajes centrales de la familia más bella del mundo.

A **Hugo**, que ha compartido conmigo esta impresionante dimensión científica en la que nos hemos maravillado y crecido juntos. Gracias por ser mi compañero, amigo, camarada, co-autor y nopvio.

A **Bernardo Vargas**, un cuñado-amigo-hermano que admiro y quiero harto. P.D. También estás invitado a todas mis fiestas!

A mis abuelos **Victor, Amado, Luz y Dolores**, que guían mi camino desde su morada.

A mis tíos **Lupe, Rosario y Pepe Ruiz** y mi primo **Wilphen Vázquez** por compartir conmigo cada etapa de mi vida académica y por su apoyo incondicional.

A **Jessica Ruiz y Flor Sierra**, que contribuyeron durante su servicio social en mi proyecto y que además se convirtieron en mis hijas amadas.

A mi amigo **Leonardo Martínez** por ser un alma noble y valiente.

A mis compañeros del laboratorio **Mariana, Julieth, Milka José, Bárbara, Yanis, Juan, Roberto y Pedro** por el apoyo y la amistad que me brindaron.

A **Azucena** de enseñanza, por ser una extraordinaria auxiliar del PDCB.

A los todas las personas que dejaron una profunda huella en mi ser durante mi paso por la medicina, en especial, a los habitantes de Yucatán

A todos, "**chido banda**"

"Yo estoy resuelto a luchar contra todo y contra todos sin más baluarte que la confianza y el apoyo de mi pueblo." **Emiliano Zapata.**

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
AcNPV	<i>Autographa Californica</i> múltiple nuclear polyhedrosis virus
AcNPV-LC3	<i>Autographa Californica</i> múltiple nuclear polyhedrosis virus recombinante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA.	Absceso hepático amibiano
AI	Amibiasis intestinal
ALT	Alaninoaminotransferasa
ARN	Ácido ribonucleico
BVs	Viriones libres
CDs	Células dendríticas
CDR	Dominio rico en carbohidratos
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CEI.	Células del epitelio intestinal
CES	Células endoteliales sinusoidales
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CES	Células no parenquimatosas fenestradas
CHO	Células de ovario de hámster chino
CMV	Citomegalovirus
ConA	Concanavalina A
CPs	Cisteinproteasas
CpGs	Regiones de ADN ricas en citosina y guanina
CRD	Dominio rico en carbohidratos
CREHP	Proteína rica en cisteínas de <i>E. histolytica</i>
CPAs	Células presentadoras de antígeno
DCs	Células dendríticas
DS	Espacio de Disse

EhCP	Proteinasa de cisteína de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhROM1	Proteasa de <i>E. histolytica</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. hartmanni</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. moshkovskii</i>	<i>Entamoeba. moshkovskii</i>
EhCP5	Proteasa de cisteína 5 de <i>E. histolytica</i>
EhLPG	Lipopéptidoglicano de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhLPPG	Lipofosfopéptidoglicano de <i>Entamoeba histolytica</i>
Ehserp	Serinproteasa de <i>E. histolytica</i>
EhROM1	Proteasa de serina intra-membranal de <i>E. histolytica</i>
EP4R	Receptor de prostaglandina E ₂
FDA	Food and drug administration
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GVs	Granulovirus
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
IFN	Interferón
IgAs	Inmunoglobulinas isotipo A secretoras
IgG	Inmunoglobulinas isotipo G
IgM	Inmunoglobulinas isotipo M
IHA	Inhibición de hemaglutinación
IL	Interleucina
iNKT	Células T asesinas naturales com receptor invariante
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
kDa	Kilodalton
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico
Lectina de <i>E. histolytica</i>	lectina de unión a galactosa de <i>E. histolytica</i>

LPS	Lipopolisacárido
LSEC	Células endoteliales fenestradas
MBP	Proteína de unión a manosa
MUC2	Mucina 2
NCs	Nucleocápsides
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células T asesinas naturales
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NPVs	Nucleopolyhedrovirus
OBs	Cuerpos de oclusión
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
pb	Pares de bases
PDV	Virión derivado de la polihedra
PGE ₂	Prostaglandina E2
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PRRs	Receptor de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
SREHP	Proteína rica en serinas de <i>E. histolytica</i>
Th	Células T cooperadoras
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores

VPH Virus del papiloma humano

Índice

Resumen	13
Abstract	15
Antecedentes	
Historia de la amebiasis	18
Epidemiología de la amibiasis	21
Clasificación taxonómica	29
Ciclo biológico	29
Formas clínicas	31
Respuesta inmune en la infección por amiba	33
Respuesta inmune innata en amibiasis intestinal	34
Respuesta inmune adaptativa en amibiasis intestinal	40
<i>E. histolytica</i> y la infección hepática	42
Anatomía, función y respuesta inmune del hígado	42
Absceso hepático amibiano	44
Candidatos a vacuna contra amibiasis	47
Baculovirus	53
Clasificación de la familia <i>baculoviridae</i>	54
Ciclo de infección	55
Baculovirus como herramienta biotecnológica	56
Planteamiento del problema	59

Hipótesis	60
Objetivo general	60
Objetivos particulares	60
Materiales y métodos	61
Células y cultivos	61
Producción de baculovirus recombinantes de expresión	62
Producción de baculovirus recombinantes de despliegue	63
Recombinación homóloga	64
Selección de clonas recombinantes a partir de ensayo de placa lítica y titulación.	65
Amplificación y purificación de baculovirus recombinantes AcNPV-LC3	66
Transducción de células HepG2 con baculovirus recombinantes y Western blot	67
Protocolo de inmunización, sangría y reto intra-portal con <i>E. histolytica</i>	67
Elisa	70
Ensayo de proliferación celular	71
Pruebas bioquímicas de función hepática	72
Análisis estadístico	73
Resultados	
Producción de baculovirus recombinantes de expresión AcNPV-LC3, AcNPV-CREHP y AcNPV-SREHP	74

Identificación de baculovirus recombinantes de expresión de LC3 y transducción de células de mamífero	75
Producción de baculovirus recombinantes de despliegue AcNPV _{display} -LC3, AcNPV _{display} -CREHP y AcNPV _{display} -SREHP.	77
Inmunización oral y nasal con AcNPV-LC3 protege a hámsteres del desarrollo de AHA	68
Vacunación oral y nasal con AcNPV-LC3 induce anticuerpos anti-amiba en sangre	79
Vacunación oral y nasal con AcNPV-LC3 induce respuesta inmune mediada por células	84
El grado de protección contra AHA en inmunizados con AcNPV-LC3 visto por microscopía, se corroboró con pruebas de función hepática	86
Inmunización intramuscular con AcNPV-LC3 confiere protección contra el desarrollo de AHA en hámsteres retados	87
Determinación de daño hepato-celular en relación a la protección (esterilizante o parcial)	90
Expresión de IFN γ e IL-4 en parénquima hepático de hámsteres inmunizados y retados para AHA con diversos grados de protección	90
Discusión	94
Conclusiones	104
Referencias	105

Resumen

La amibiasis es la infección ocasionada por el parásito *Entamoeba histolytica* y puede provocar infección intestinal o extra-intestinal, de esta última localización, el absceso hepático amibiano (AHA) es la forma más frecuente. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la amibiasis es considerada un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, por este motivo, recomiendan el desarrollo de una vacuna oral. En este sentido, el principal candidato antigénico para el desarrollo de dicha vacuna es una lectina de unión a galactosa de *E. histolytica*, sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un adyuvante que sea eficiente y seguro para inducir respuesta inmune protectora en mucosas para uso humano. En este trabajo, nosotros demostramos por primera vez protección contra el desarrollo de AHA en hámsteres producido por la inmunización oral, nasal e intramuscular con un baculovirus recombinante AcNPV que conduce la expresión del fragmento LC3 de la lectina de *E. histolytica* en células del hospedero. Nuestros datos muestran que todas las rutas de inmunización dan por resultado una respuesta humoral y celular antígeno-específica que confiere protección total (sin abscesos hepáticos) en 57.9, 21 y 55% de los animales inmunizados (vía oral, nasal e intramuscular, respectivamente) y protección parcial (absceso hepático en $\leq 20\%$ del parénquima hepático) en el 21 y 20% en la administración oral e intramuscular, respectivamente. Por otra parte, una alta proporción de células proliferantes por exposición a antígeno de trofozoítos, independientemente de la ruta de inmunización fue observada. Además, altos niveles de anticuerpos IgG séricos anti-lectina de *E. histolytica* fueron solo parcialmente responsables de la protección contra AHA.

También, el grado de protección se relacionó con la expresión de interferón gamma (citocina relacionada a respuesta protectora en amibiasis hepática) y con niveles normales de alaninoaminotransferasa (transaminasa cuya elevación indica daño hepatocelular). Estos hallazgos sugieren que el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 induce una respuesta inmune celular, capaz de conferir protección ante el reto de absceso hepático, por lo que podría ser utilizado como un vector y sistema de liberación para la inmunización en mucosas contra la amibiasis.

Abstract

Human amoebiasis is the infection caused by *Entamoeba histolytica*, parasite that produced intestinal or extra-intestinal damage, where the amebic liver abscess (ALA) is most common. According to the World Health Organization (WHO) the amoebiasis is considered a public health problem in developing countries, for this reason they recommend the development of an oral vaccine. In this regard, the leading antigen for vaccine development is a galactose-binding lectin; however, currently no exists an efficient and safe adjuvant to human use that induced a protective mucosal immune response. In this work, we demonstrate for the first time protection against the development of ALA in hamsters induced by oral, nasal and intramuscular immunization with an AcNPV recombinant baculovirus driving host cell expression of the *E. histolytica* LC3 Gal-lectin fragment. Our data showed that all routes immunization resulted in humoral and cellular antigen-specific responses that conferred total protection (without liver abscess) in 57.9, 21 and 55% of immunized animals (oral, nasal and intramuscular respectively) and partial protection (liver abscess in $\leq 20\%$ of liver parenchyma) in 21 and 20% in oral and intramuscular administration, respectively. In the other hand, a high proportion of proliferating cells upon exposition to trophozoite's antigens, independent of the route of immunization was observed. In addition, high level of IgG antibodies in hamsters immunized by all routes was obtained; suggest that anti-Gal-lectin IgG antibodies may be only partially responsible for protection against ALA.

Also the degree of protection was associated with the expression of interferon gamma (cytokine-related protective response in ALA) and with normal levels of alanine aminotransferase (transaminase elevation indicates hepatocellular damage). These findings

suggest that the recombinant baculovirus AcNPV-LC3 induces a cellular immune response capable of conferring protection against the challenge of ALA, and could be used as a vector and delivery system for mucosal immunization against human amoebiasis.

Antecedentes

La amibiasis es considerada como uno de los principales problemas de salud pública por parásitos en países en vías de desarrollo de todo el mundo. Esta enfermedad es causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), un parásito protozoario que es capaz de colonizar la mucosa del intestino grueso del humano y en pocos casos, el parásito es capaz de invadir y esparcirse a otros órganos, ocasionando amibiasis extra intestinal. Ya que es un parásito que se adquiere con la ingesta de agua y alimentos contaminados, la transmisión de la enfermedad está asociada a deficientes condiciones sanitarias prevalentes en países en vías de desarrollo, por lo que la implementación de medidas sanitarias, el diagnóstico y tratamiento oportuno son, en teoría, las medidas adecuadas para controlar la morbi-mortalidad de esta enfermedad (Carrero y cols, 2010). Por otra parte, aun cuando el tratamiento farmacológico con nitroimidazoles, en la mayoría de los casos es efectivo, los efectos secundarios condicionan su abandono y por lo tanto, falla terapéutica en los portadores, lo que culmina en la prevalencia del parásito en la comunidad. Como suele suceder con muchas enfermedades infecto-contagiosas, los esfuerzos que se han hecho en algunos países en vías de desarrollo a través de campañas para la implementación de medidas sanitarias, de diagnóstico y de tratamiento farmacológico oportuno, no han logrado su propósito debido a la falta de consistencia y de aplicación extensiva (Alcántara y cols, 2008). Por estas razones, el desarrollo de una vacuna contra la amibiasis se mantiene como una alternativa viable y tal vez, la herramienta más efectiva para el control y erradicación de esta enfermedad.

Historia de la amebiasis

A pesar de que el primer registro proviene de Hipócrates (460-377 A.C), la primera descripción de la amebiasis data de 1875 y fue realizada por el doctor Fedor Aleksandrovich Lesh en la revista *Virchows Archiv für pathologisch Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* en donde publicó el artículo titulado “Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso”. En este trabajo, describió el padecimiento de J. Markow, un granjero que presentó múltiples evacuaciones diarreicas color gris-rojizo acompañadas de coágulos mucosanguinolentos que al microscopio describió como “gran cantidad de células móviles” que reconoció como “parásitos animales o amibas”; además, describió los síntomas relacionados con la enfermedad como anorexia, dolor abdominal y tenesmo. Después de varios episodios de remisión, el paciente falleció con “síntomas de anemia acentuada y agotamiento general”. Lesh le realizó una autopsia en la que encontró “edema y congestión en la mucosa de la mitad inferior del íleon y en el ciego lesiones semejantes pero más extensas y cubiertas por una capa mucosanguinolenta sobre las áreas de ulceración y cicatrización”. Al realizar una observación histológica de las lesiones describió “infiltración celular en la submucosa y amibas”, semejantes a las encontradas en las heces. De acuerdo a esta observación, ilustró y describió de manera muy precisa a los parásitos observados y al comparar las características de estas con las amibas de especies conocidas, concluyó que las amibas que encontró en Markow pertenecían a una nueva especie a la cual propuso denominar *Amoeba coli*. A pesar de que Lesh describió una relación directamente proporcional entre el número de amibas encontradas en las heces y la intensidad de los síntomas y de que logró infectar a un perro con amibas provenientes de heces de Markow, no pudo resolver la interrogante de si la enfermedad fue producida por las amibas que él aisló o si fue resultado de otra causa y las amibas infectaron posteriormente al sujeto y

mantuvieron el proceso. Finalmente, concluyó que Markow inicialmente enfermó de disentería y las amibas constituyeron una infección secundaria que prolongó el proceso inflamatorio. Por otra parte, el médico griego Stephanos Kartulis, publicó en 1886 un artículo sobre el papel patógeno de las amibas en los *Archives de Virchow* y aseguró haber encontrado 150 casos de disentería; posteriormente, en 1887 realizó un estudio del absceso hepático tropical en 20 pacientes en donde encontró amibas en la totalidad de los mismos (Romero-Caballero R, 2008).

El nombre de *Entamoeba histolytica* fue dado al parásito por Fritz Schaudinn en 1903. Por su parte, el parasitólogo francés Emile Brumpt en 1925, sugirió la existencia de dos especies de amibas, una causante de enfermedad invasiva (*Entamoeba histolytica*) y otra especie morfológicamente indistinguible pero no patógena (*Entamoeba dispar*). Esta teoría estuvo basada en la observación de un individuo infectado durante 8 años con lo que hasta ese momento se consideraba *E. histolytica*, que no desarrolló enfermedad durante este tiempo, además de la incapacidad de los quistes de este sujeto de producir infección en gatos (modelo considerado como susceptible a la infección en ese tiempo). Además, Brumpt observó la existencia de estudios epidemiológicos que reportaban un porcentaje importante de infección, aparentemente por *E. histolytica*, en países en donde la enfermedad invasiva no se conocía. Por estos hallazgos, concluyó que la infección en estos países estaba dada por una especie diferente difícil de distinguir de *E. histolytica* a la que nombró *E. dispar*; sin embargo, su teoría no fue aceptada en ese momento. Por otra parte, para 1919 se aceptaba la existencia de *E. hartmanni* como una especie distinta de *E. histolytica* (Romero-Caballero R, 2008).

La teoría de Brumpt quedó en el olvido hasta que en 1973 el Dr. Martínez Palomo publicó un trabajo en el que encontró diferencias en aglutinación entre aislados de *E.*

histolytica de individuos con manifestaciones clínicas, de aquellos obtenidos de pacientes asintomáticos. Éste fue el primer indicio de una diferencia bioquímica entre *E. histolytica* patógena y no patógena (Martínez-Palomo y cols 1973).

Otro hallazgo publicado por Sargeant y cols en 1978 en la revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, reveló la posibilidad de diferenciar a *E. histolytica* invasiva y no invasiva por electroforesis de isoenzimas. En este trabajo, 85 muestras de *E. histolytica* fueron comparados por patrones de electroforesis de tres enzimas: la glucosa fosfato isomerasa, la fosfoglucomutasa y la L-malato NADP+ oxidorreductasa. Encontraron que las muestras se podían dividir claramente en dos grupos: el primero que incluía aislados de los de pacientes con amibiasis invasiva y de portadores asintomáticos, y el segundo grupo solo de portadores asintomáticos (a este aislado lo denominaron *E. histolytica* no-patógena; Sargeant y cols, 1978).

Este estudio fue apoyado por el trabajo de Strachan y cols publicado en Lancet en 1988, en el cual describieron diferencias antigénicas entre aislados de dos grupos (Strachan y cols, 1988). Para 1989, Tannich y cols publicaron un trabajo en el que encontraron diferencias genómicas entre *E. histolytica* patogénica (HM-1:IMSS) y no patogénica (Tannich y cols, 1989). Por otra parte, Martínez-García y cols en 1990 publicaron un trabajo en el que encontraron zimodemos distintos de *E. histolytica* patógena y no patógena en áreas rurales de México; interesantemente, el patrón de zimodemos patógenos no mostró correlación con serología positiva para *E. histolytica* por inhibición de hemaglutinación (IHA) (Martínez-García y cols 1990). En ese mismo año, de Meeste y cols encontraron diferencias entre las proteasas de cisteína de *E. histolytica* patógenas y no patógenas (de Meester y cols, 1990) y Petri y cols demostraron que cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* pueden diferenciarse por anticuerpos monoclonales contra la lectina de unión a

galactosa (Petri y cols, 1990). Numerosos trabajos se publicaron en los siguientes años describiendo diferencias entre estas cepas, hasta que en 1993, Diamond y Clark publicaron el trabajo titulado “A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925” en la revista Journal of Eukaryotic Microbiology (Diamond y Clark, 1993).

Sin embargo, no fue sino hasta 1997 durante el XIII Seminario sobre Amibiasis realizado en la Ciudad de México, que un comité de expertos de la Organización mundial de la salud (OMS) aceptó la hipótesis de Brumpt de la existencia de dos especies: *E. histolytica* y *E. dispar*, determinado por los trabajos descritos anteriormente con respecto al análisis de isoenzimas, estudios bioquímicos, moleculares, inmunológicos y genéticos (Tannich y cols, 1989, Clark, 1995).

Epidemiología de la amibiasis

A mediados de los años 80, se reportó que la amibiasis ocasionaba hasta 100 mil muertes anualmente (Walsh, 1986). Una década después, un reporte epidemiológico de la OMS posicionó a la amibiasis como la segunda causa de mortalidad por parásitos protozoarios, antecedida por la malaria (WHO, 1997). Sin embargo, es necesario considerar que a partir de 1997, año en que fuera aceptada la teoría de Brumpt de la existencia de dos especies de *Entamoeba* idénticas morfológicamente pero diferentes en su capacidad de producir enfermedad en el hombre (*E. histolytica* y *E. dispar*), fue necesario replantear la epidemiología de la amibiasis por *Entamoeba*, tomando en cuenta que la mayoría de los casos asintomáticos documentados podrían deberse a *E. dispar*.

Además, es indispensable mencionar la existencia de otra amiba indistinguible morfológicamente de estas dos especies, *Entamoeba moshkovskii* (*E. moshkovskii*), a la cual sólo hasta hace poco se le empezó a considerar en estudios epidemiológicos y no fue encontrado asociada a amibiasis invasiva. La distribución de estas especies de amibas es cosmopolita; sin embargo, de manera general se acepta que *E. histolytica* y *E. dispar* prevalecen en los países en vías de desarrollo, mientras que *E. moshkovskii* se distribuye en países industrializados (Ximénez y cols, 2011). Está reportado que *E. histolytica* ocasiona manifestaciones clínicas en aproximadamente el 10-25% de las personas con amibiasis y fue propuesto que el porcentaje restante cursa con infección asintomática; es frecuente que estos individuos no reciban tratamiento, y por lo tanto, se conviertan en eficientes portadores y transmisores de la enfermedad. Sin embargo, ya que estos datos no consideran la infección por *E. dispar*, el porcentaje de manifestaciones clínicas por *E. histolytica* debe aún de ser determinado (Ximénez y cols, 2009, Ralston y Petri 2011).

El panorama se complica si consideramos la reciente publicación acerca del aislamiento de *E. dispar* a partir de pacientes con manifestaciones clínicas de amibiasis. En Brasil, la cepa ICB-ADO de *E. dispar* fue aislada de un paciente con colitis sin disentería (Costa y cols, 2006), y se demostró que es capaz de producir absceso hepático amibiano en el modelo de amibiasis en hámster (Shibayama y cols, 2007). Por otra parte, en México, se demostró la presencia de *E. dispar* a partir de ADN obtenido de material de absceso hepático de seis pacientes (Ximénez y cols 2010).

Actualmente, la epidemiología de este parásito se está redefiniendo mediante técnicas inmunológicas (detección de antígeno y anticuerpo) y moleculares (amplificación de la subunidad pequeña de rARN, ADN circular extra-cromosomal y 18s ARN) que han

mejora por el diagnóstico para distinguir entre estas especies (Ximénez y cols, 2011); de esta manera, se pretende conocer de manera precisa la incidencia y prevalencia de la amibiasis intestinal asociada a *E. histolytica*.

Con respecto a México, la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública, la última encuesta seroepidemiológica nacional mostró una seroprevalencia del 8.4% en la población general mediante ensayos de hemaglutinación indirecta (Caballero-Salcedo y cols, 1994). Datos publicados en el cuaderno de FUNSALUD No. 36 dedicado a las parasitosis intestinales en México publicado en el año 2002, mostraron que la incidencia de la amibiasis durante el periodo comprendido entre el año 1995 al 2000 disminuyó de manera importante en niños menores de 4 años, mientras que en el resto de la población se mantuvo en la misma tasa (Figura 1). Al comparar estos datos con la incidencia reportada en el 2010 en el portal del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y control de Enfermedades (CENAVECE), es considerable la disminución de la incidencia en todos los grupos de edad en donde el intervalo es de 264-1146/100 000 habitantes con una incidencia de 426 por 100 000 habitantes (Tabla 1).

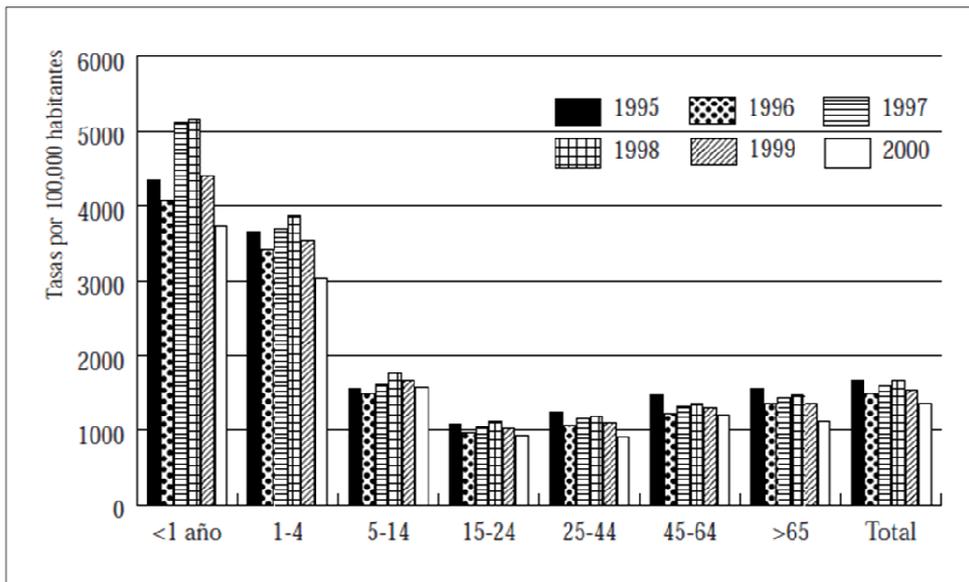


Figura 1. Incidencia de amebiasis intestinal por grupo de edad en el periodo de 1995-2000.
Fuente. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA

A pesar de que la incidencia de esta parasitosis intestinal va en disminución, la amebiasis intestinal ocupó la novena causa de morbilidad durante el 2010, con mayor predominio en adultos de 25-44 años con un total de 462, 767 casos reportados (Tabla 2).

La amebiasis intestinal en el territorio nacional tiene una mayor incidencia (990-61288/100 000 habitantes) en los estados de Oaxaca y Guerrero, seguidos por Nayarit, Hidalgo, Chiapas, Yucatán, Campeche y Tabasco (693-990/100 000 habitantes), después por Baja California Sur, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Veracruz, Morelos, Puebla, Colima, Aguascalientes y Quintana Roo (396-693/100 000 habitantes), en el resto de los estados del norte y centro del país se presenta la incidencia más baja (97.4-395/100 000 habitantes) (Figura 2).

Tabla 1. Incidencia de amibiasis intestinal por grupo de edad en México durante el 2010. Fuente CENAVECE, 2010.

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Incidencia de los casos nuevos de enfermedades por grupo de edad Según registro semanal de casos probables Estados Unidos Mexicanos 2010 Población General													
Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Tasa*	Grupos de edad										
			< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +
Accidentes de transporte en vehículos con motor	V20-V29; V40-V79	75.35	17.59	23.68	24.82	35.24	101.06	140.73	95.70	97.10	70.19	75.09	40.26
Amebiasis intestinal	A06.0-A06.3, A06.9	426.92	1042.93	1146.24	653.53	431.92	297.68	299.25	264.75	350.62	358.07	452.80	415.80
Anencefalia**	Q00.0	0.07	0.07	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
Ascariasis	B77	80.48	56.67	273.24	207.45	121.24	64.12	44.60	29.93	48.36	35.75	49.45	38.58
Asma y estado asmático	J45, J46	305.36	590.60	893.40	620.49	331.60	159.44	152.48	160.38	242.19	259.58	338.86	299.31
Bocio endémico	E01	0.52	0.11	0.07	0.08	0.14	0.29	0.33	0.61	1.06	1.17	1.56	0.78
Brucelosis	A23	2.52	0.21	0.51	1.69	2.00	2.41	2.53	3.15	3.36	3.16	3.09	2.62
Candidiasis urogenital	B37.3-B37.4	270.79	16.43	9.31	9.85	29.26	240.05	545.20	465.39	428.60	210.95	160.80	78.73

Tabla 2. Principales causas de morbilidad por grupo de edad a nivel nacional durante el 2010 en México. Fuente CENAVECE, 2010.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Veinte principales causas de enfermedad nacional por grupo de edad															
Segun registro semanal de casos probables															
Estados Unidos Mexicanos 2010															
Poblacion General															
Número	Padecimiento	Codigo de la lista detallada CIE10a. Revision	Grupos de edad											Total	
			< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +		Ign.
1	Infecciones respiratorias agudas	J00-J06, J20, J21 excepto J02.0 y J03.0	2 629 152	6 202 461	4 082 598	2 482 922	1 595 030	1 484 413	4 803 710	1 167 774	1 789 319	754 316	1 360 050	14 950	28 366 695
2	Infecciones Intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A08-A09 excepto A08.0	368 411	1 023 719	541 913	360 030	263 921	317 682	1 006 358	224 314	349 229	144 958	319 897	3 027	4 923 459
3	Infección de vias urinarias	N30, N34, N39.0	23 670	146 924	177 800	139 145	274 927	374 304	1 204 032	280 439	452 229	188 166	403 936	5 768	3 671 340
4	Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	N.A.	N.A.	N.A.	80 353	128 063	158 843	540 924	160 554	220 116	96 731	177 399	1 686	1 564 669
5	Otitis media aguda	H65.0-H65.1	23 618	110 503	109 054	69 117	49 760	45 242	128 511	36 939	39 819	16 381	24 444	646	654 034
6	Gingivitis y enfermedades periodontales	K05	850	12 344	38 711	42 483	57 724	63 106	180 808	55 000	67 891	30 388	41 362	1 214	591 881
7	Hipertension arterial	I10-I15	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1 680	5 629	113 593	66 146	141 537	68 950	140 119	1 424	539 078
8	Conjuntivitis	B30, H10.0	35 200	64 716	53 789	43 897	37 746	34 927	109 819	31 263	38 861	16 784	31 719	945	499 666
9	Amebiasis intestinal	A06.0-A06.3/A06.9	19 801	87 051	66 439	46 779	31 117	29 289	87 302	21 930	32 268	13 635	26 664	492	462 767
10	Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	E11-E14	17	43	92	251	742	3 427	88 125	57 328	123 028	56 072	90 044	863	420 032

Estos datos están claramente relacionados con el desarrollo socio-económico de los estados lo que indica que el uso de medidas higiénico-dietéticas es importante en el control de la transmisión; a pesar de ello, la amibiasis intestinal es una enfermedad endémica y la novena causa de morbilidad en México.



Figura 2. Incidencia y distribución de la amibiasis intestinal en la República Mexicana durante el 2010.

Fuente CENAVECE, 2010.

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Por otra parte, de acuerdo a los datos publicados en FUNSALUD en el año 2002, la incidencia de la amibiasis hepática se mantuvo durante el periodo comprendido entre el año 1995 al 2000 y de acuerdo a este reporte, el grupo de edad más vulnerable es el de niños menores de 5 años (Ximénez C y cols, 2009) (Figura 3).

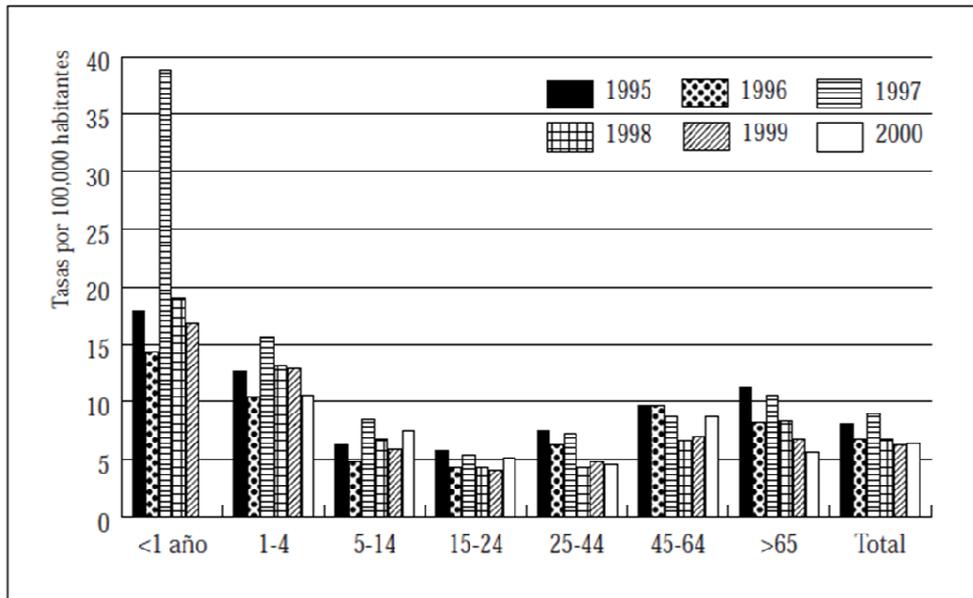


Figura 3. Incidencia de absceso hepático amibiano por grupo de edad en el periodo de 1995-2000.
Fuente. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA

Datos recientes obtenidos de la Dirección General de Epidemiología al 7 de agosto del 2010, reportaron 48 casos de absceso hepático amibiano (AHA) en los estados de Guerrero y Oaxaca, lo que coincide con la mayor incidencia de amibiasis intestinal reportada durante el 2010 en esos estados. Además, es de hacerse notar el aumento en el número de casos con respecto a los 9 casos reportados durante el 2009 en los mismos estados. Desafortunadamente, no existen reportes de la incidencia del AHA a nivel nacional; sin embargo, actualmente, se estima que la incidencia del absceso hepático amibiano es de 10 por cada 100,000 habitantes (Ximénez y cols, 2009) lo que indica la incidencia del AHA se mantuvo estable en nuestro país en los últimos 15 años.

Clasificación taxonómica

Reino: Protista

Phylum: *Sarcomastigophora*

Subphyla: *Sarcodina*

Clase: *Lobosea*

Familia: *Endamoebidae*

Género y especie: *Entamoeba histolytica*

El *subphylum sarcodina* está constituido por organismos que tienen locomoción por protrusiones citoplasmáticas denominadas pseudópodos, uno o más núcleos dependiendo del estadio y que se multiplican por fisión binaria. En esta clasificación se encuentran las amibas de vida libre, las amibas no patógenas que colonizan el intestino y *Entamoeba histolytica* (Ravdin, 1988).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *E. histolytica* es considerado monoxénico (Tay-Zavala, 2008) y por lo tanto, la única fuente de infección y diseminación es el hombre; sin embargo, se considera que los perros y los simios son reservorios aunque su papel en la diseminación aún es demostrado.

La forma móvil de *E. histolytica* denominada trofozoíto es el estadio vegetativo que coloniza el lumen del intestino grueso en donde se multiplica y en algunos casos puede invadir la mucosa colónica ocasionando amibiasis intestinal (AI) y eventualmente, a través de diseminación sanguínea por vena porta, lesiones extra-intestinales como el AHA, el absceso cerebral y el absceso pulmonar (Figura 1). Algunos trofozoítos durante su paso a través del colon transverso y descendente, mediante mecanismos poco conocidos, se

diferencian a quiste, el estadio de resistencia y responsable de la transmisión entre individuos. Estas estructuras de resistencia son excretadas en las heces de los portadores contaminando el agua y alimentos de consumo humano, cerrando el ciclo biológico cuando son ingeridos de nueva cuenta. Otra vía de transmisión poco frecuente es por contacto directo de trofozoítos de persona a persona la cual ocasiona la amibiasis mucocutánea (Tay-Zavala, 2008).

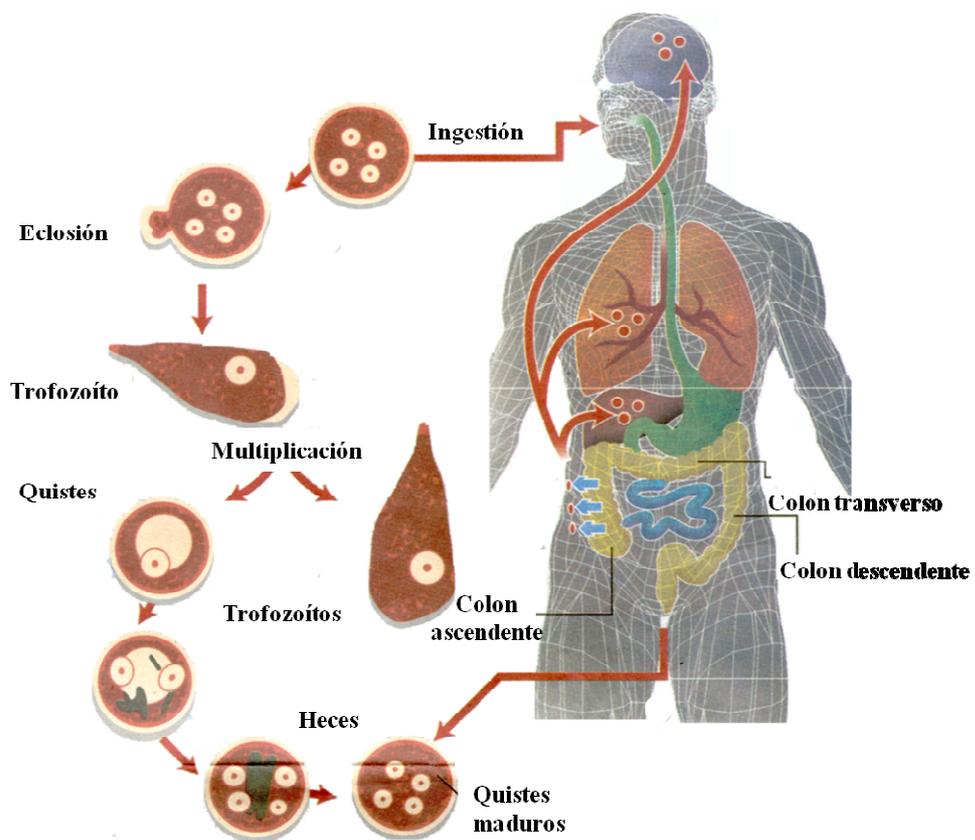


Figura 4. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Tomado de Carrero y cols, 2006.

Formas clínicas

Se define a la amibiasis como el desarrollo y reproducción de *E. histolytica* en el hombre y a la enfermedad amibiana, como la producción de lesiones tisulares con manifestaciones clínicas (amibiasis invasora). La amibiasis intestinal se clasifica en 4 tipos: amibiasis aguda disintérica, la colitis fulminante, la apendicitis amibiana y el ameboma.

La disentería amibiana se caracteriza por evacuaciones mucosanguinolentas, generalmente de tres a cinco por día, o francamente diarreica, las cuales se acompañan de dolor en marco cólico de leve a moderado y tenesmo (en la disentería no diarreica). Por otra parte, la colitis fulminante se caracteriza por 20 o más evacuaciones al día acompañadas de sangrado intenso, cólico severo, tenesmo constante, anorexia, náusea e hipertermia de 39 a 40 °C. En ocasiones, se describe un cuadro franco de peritonitis por la perforación intestinal provocada por las lesiones ulcerosas necróticas y confluentes encontradas en esta patología (Figura 5A). En cuanto a los amebomas, son lesiones pseudo-tumorales constituidas por edema, fibrosis e infiltrado inflamatorio localizado en mucosa y submucosa ulcerada y necrótica de ciego, recto sigmoides, colon ascendente o ángulos hepático o esplénico del colon. Por último, la apendicitis amibiana es clínicamente indistinguible de la bacteriana excepto por disentería amibiana que acompaña el cuadro. En estas formas clínicas, el diagnóstico histopatológico es indispensable (Alcántara y cols, 2008).

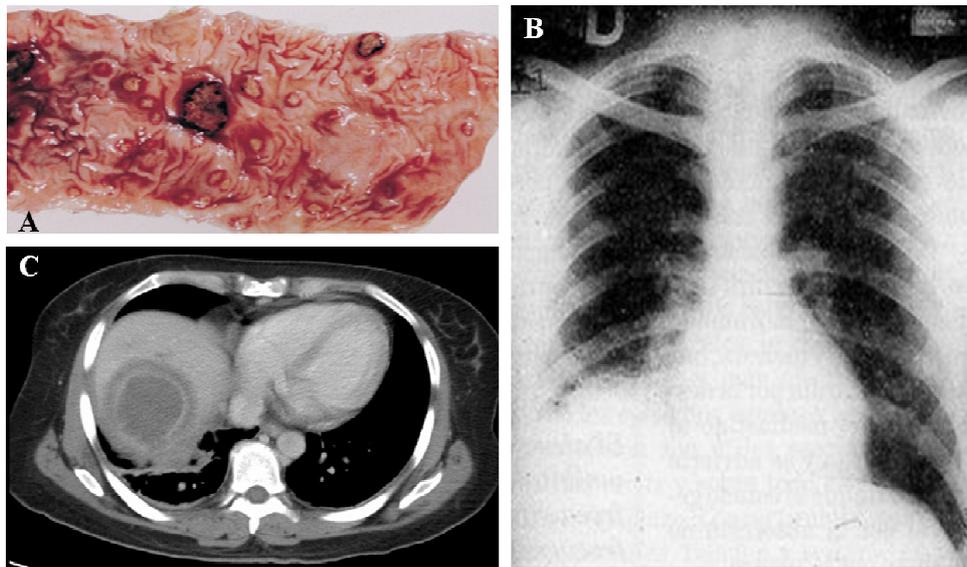


Figura 5. Amibiasis intestinal y extra-intestinal. A. Píeza quirúrgica de paciente con colitis amibiana. Se observan varias lesiones nodulares con centro necrótico, rodeadas de áreas elevadas de mucosa edematosa e hiperémica. B. Teleradiografía de tórax patognomónica de AHA que muestra elevación del hemidiafragma derecho y pleunitis reactiva del mismo lado. C. Tomografía axial computarizada de paciente con AHA en lóbulo derecho. Tomado de Espinosa-Castellano M y Martínez-Palomo A, 2000 y Kaushika W, Garvin y James H. Willig, 2010.

Por otra parte, la amibiasis extra-intestinal se presenta en órganos como el hígado, pulmón, corazón y cerebro. La forma más común de amibiasis extra intestinal es el AHA, el cual se produce por diseminación hematogena de amibas a través de la vena porta a partir de un foco de amibiasis invasora en el intestino; generalmente, en estos pacientes no hay antecedentes de disentería amibiana o detección del parásito en estudios coproparasitológicos. Las manifestaciones clínicas son malestar general, anorexia, hipertermia de 39-40°C, hepatomegalia dolorosa a la palpación, pérdida de peso y anemia. La biometría hemática evidencia anemia, leucocitosis y neutrofilia, sin embargo, el diagnóstico se realiza habitualmente a través de pruebas de imagen como radiografía, ecografía, tomografía axial computarizada, gammagrafía y resonancia magnética (Figura 5B y C). El diagnóstico se confirma con serología positiva y/o aislamiento del parásito en el contenido aspirado de la lesión. Las complicaciones potenciales del absceso hepático son la ruptura al mediastino, pleura pulmonar, pulmón, pericardio, corazón, peritoneo o la

formación de una fístula percutánea. Otras formas de presentación extra-intestinal son la amibiasis pulmonar y cardíaca, generalmente por complicación de la amibiasis hepática. Por su parte, la amibiasis cerebral se disemina por el plexo venoso vertebral o a partir del pulmón (Alcántara y cols, 2008), pero al igual que la mucocutánea es poco frecuente.

El tratamiento de la amibiasis intestinal asintomática, habitualmente se basa en medicamentos con acción amebicida en el lumen del intestino, como el furoato de diloxanida, el iodoquinol, la paramomicina. En la infección intestinal sintomática y extraintestinal (AHA) se utilizan fármacos como el metronidazol y el tinidazol (González y cols, 2009). En los casos de falla terapéutica por resistencia al metronidazol (Orozco y cols, 2002), se adiciona cloroquina al tratamiento o se utiliza tinidazol.

Respuesta inmune en la infección por amiba

El conocimiento de los mecanismos patogénicos del trofozoíto de *E. histolytica* y su estrecha relación con la respuesta inmune del hospedero es indispensable para emplear las herramientas adecuadas en el desarrollo de una vacuna exitosa para prevenir la amibiasis. Una recopilación de estos mecanismos, se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos patogénicos de la amiba y respuesta inmune del hospedero. Modificada de Mortimer y Chadee, 2010

Molécula	Mecanismo patógeno	Respuesta del hospedero
Lectina de <i>E. histolytica</i>	Adherencia Apoptosis Fagocitosis Induce producción de citocinas pro-inflamatorias (CDR) Epítopos de CD55 y proteína de 21 kDa (evasión del complemento)	IgA contra CDR previene colonización Reconocimiento por PRR
LhLPPG/LhLPG	Anclado a la membrana tiene función de adhesión Secretable induce activación de células de la respuesta inmune Invasión de complemento	Reconocido por TLR 2 y TLR 4 Activación de NF- κ B Monocitos y macrófagos expresan: IL1 α , IL-8, IL-12, IL-10 e IL-6 Presentado por CD74 a NKT expresan: IFN γ
Proteasas de cisteína	Rompe gA1, IgA2 e IgG Rompen MUC2 Degrada colágeno y elastina Degrada MEC Rompe C3 activando la vía alterna del complemento Inactivan las anafiltoxinas C3a y C5a	Producción de citocinas pro-inflamatorias
ChCP5	Migración en el AHA	
Su. peróxido dismutasa NADPH: Flavin oxidorreductasa	Detoxificación de superóxido Detoxificación de H ₂ O ₂	Producción de NOS y ROS por macrófagos y neutrófilos
Peroxiredoxina	Detoxificación de H ₂ O ₂	
Lhserp	Inactiva a la catepsina G	?
Eharginasa-1	Deposita arginina en el medio	?
PGE2	Rompe uniones estrechas entre CEl Inhibe expresión de MHC II y TNF α	Induce respuesta inflamatoria Activación de CD hacia Th17
Amebaporo	Péptidos formadores de poros	?
KFRP1	Contacto con hospedero en AHA Resistencia a componentes sanguíneos y respuesta inflamatoria	Desencadena inflamación durante AHA
EhROM1	Distribución, formación y liberación de los "Caoping". Rompe el dominio trans-membranal de la subunidad pesada de la Gal-ectina, para el escape del sistema inmune.	?
β EH1 NR	Molécula parecida a β 1-integrina, similar a receptor de fibronectina favorece la interacción con la matriz extra-celular, la invasión y destrucción del tejido.	?

Abreviaturas: CRD, dominio rico en carbohidratos; PRR, Receptores de reconocimiento de patógenos; EhLPPG, lipofosfopéptidoglicano de *E. histolytica*; EhLPG, lipopeptidoglicano de *E. histolytica*; IL, interleucina; MUC2, Mucina 2; MEC, matriz extra celular; AHA, absceso hepático amibiano; EhCP5, Cisteinproteas 5 de *Entamoeba histolytica*; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; EhROM1, serinproteasa intra-membranal; EhSERP, serinproteasa de *E. histolytica*; PGE2, Prostaglandina E₂; EhROM1, proteasa romboide 1 de *E. histolytica*; MHC II, complejo mayor de histocompatibilidad clase II; CD, célula dendrítica; KFRP1, proteína rica en ácido glutámico y lisina.

Respuesta inmune innata en amibiasis intestinal

La mucosa intestinal posee una respuesta inmune altamente regulada que es indispensable para evitar la activación de una respuesta inflamatoria ante diversos antígenos de la flora comensal y la dieta, dicha modulación permite mantener la barrera del epitelio intestinal y evitar la invasión de microorganismos patógenos a la circulación sistémica. Esta regulación inmunológica está dada por múltiples mecanismos como son: la

facultad de las células del epitelio intestinal (CEI) de secretar enzimas bacteriolíticas y péptidos antimicrobianos que protegen a las superficies mucosas de microbios (Mortimer y Chadee, 2010), la presencia de microorganismos de la flora comensal que estimulan constantemente la tolerancia inmunológica a una amplia diversidad de antígenos (Artis, 2008), la presencia de sub-poblaciones de células dendríticas (CDs) que conducen a la diferenciación de linfocitos T a Treg y Treg inducibles (Tr1, Th y T Foxp3) productoras de IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Belkaid y Oldenhove, 2008) y la expresión constitutiva de IL-10 y TGF β por parte de las células epiteliales y de la respuesta inmune (Hamano y cols, 2006). Por su parte, la IL-10 favorece la producción de mucina 2 (MUC2), el cambio de isotipo en células B de IgM a IgA, suprime la activación de células presentadoras de antígeno (CPAs) y junto con TGF β , promueve la inducción de células T reguladoras (Treg) y tiene un efecto anti-apoptótico en células epiteliales (Grazia y cols, 2001; Schwerbrock, 2004; Zhou y cols, 2004; Ruiz y cols, 2005).

A pesar de estos mecanismos de regulación, cuando la barrera epitelial se rompe ante estímulos potencialmente nocivos, las CEI tienen la capacidad de presentar antígenos a través del reconocimiento por receptores tipo Toll (TLR) 2, 4, 5, 9 y por receptores tipo NOD (1 y 2) y son eficientes presentadoras de antígeno mediante la expresión de moléculas como el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) CMH I, CMH II, CD1d, TL y MIC-A/B (William, 2008; Mortimer y Chadee, 2010). El reconocimiento antigénico a través de estos receptores, dispara en las CEI la expresión de citocinas y quimiocinas como las interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-15, TNF α , IL-6 e IL-8 que reclutan células de la respuesta inmune y crean un micro-ambiente pro-inflamatorio.

Durante el proceso de invasión de la barrera epitelial por el trofozoíto de *E. histolytica*, éste libera moléculas que afectan su integridad como la prostaglandina E2 (PGE₂) que tiene la propiedad de romper las uniones estrechas de las CIE a través de su unión al receptor EP4 (Dey y cols, 2003) y la proteasa de cisteína 5 de *E. histolytica* (EhCP5) (sin expresar por *E. dispar*), una proteasa de cisteína localizada en la membrana y que al ser secretada rompe la matriz extracelular y membranas que se encuentra a su paso. Además, esta proteasa contribuye indirectamente a la expresión de citocinas pro-inflamatorias en células de la respuesta inmune y CEI, amplificando así la respuesta inflamatoria (Mortimer y Chadee, 2010).

El inicio de la invasión del epitelio intestinal por trofozoítos de *E. histolytica*, es marcado por inflamación de la mucosa y reclutamiento sub-epitelial de células de la respuesta inmune innata inducido por la activación de CEI. A continuación, se describirá brevemente el papel de estas células en la respuesta ante la infección por *E. histolytica*.

Neutrófilos

Los neutrófilos se observan desde la etapa inicial de la invasión amibiana y son reclutados por quimiocinas expresadas por CEI como la IL-8 (Yu y Chadee, 1997), por las anafilotoxinas C3a y C5a producidos por la activación del complemento (Sengelov, 1995) y por un péptido de unión a membrana del trofozoíto de *E. histolytica* (Salata y Ravdin, 1986; Chadee y cols, 1987). De acuerdo a un modelo en ratón SCID con xenoinjerto de epitelio intestinal humano, el contacto del parásito con el CEI estimula la producción de IL-1 β e IL-8, lo que conduce al reclutamiento de neutrófilos y aumento de daño tisular (Seydel y cols, 1997). Por lo descrito anteriormente, se ha considerado que los neutrófilos tienen un

papel perjudicial al facilitar la entrada del parásito a la lámina basal. Sin embargo, se ha documentado en modelos murinos naturalmente resistentes a la infección por *E. histolytica* como las cepas CBA y Balb/c, que la depleción de neutrófilos con anticuerpos monoclonales Gr-1 incrementó dramáticamente la susceptibilidad y severidad de la infección intestinal, lo que sugiere que la respuesta inmune innata es crucial para eliminar al parásito y en particular la mediada por neutrófilos (Asgharpour y cols, 2005).

El mecanismo más importante del neutrófilo contra el trofozoíto amibiano es la generación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS); sin embargo, se ha documentado que cepas de *E. histolytica* altamente virulentas son menos susceptibles a este efecto (Murray y cols, 1981; Ghadirian y cols, 1986). En este sentido, el trofozoíto de *E. histolytica* se defiende de las moléculas producidas por el estallido respiratorio mediante la expresión de enzimas como la superóxido dismutasa, que dismuta este radical altamente reactivo (Bruchhous y Tannich, 1994, 1995), una NADPH: flavin oxidorreductasa, que convierte aniones superóxido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Bruchhous y cols, 1998) y una peroxiredoxina de 29 kDa, que detoxifica de H₂O₂ y es expresada 50 veces más en *E. histolytica* con respecto a *E. dispar* (Choi y cols, 2005). Otro mecanismo descrito de la amiba contra el neutrófilo es la expresión de una serinproteasa de *E. histolytica* (Ehserp), que se une e inactiva a la catepsina G, producto de la degranulación (Riahi y cols, 2004) y la inducción de apoptosis asociada con la activación de ERK1/1 y mediada por la generación de ROS (Sim y cols, 2005). Finalmente, la destrucción de neutrófilos por *E. histolytica* da lugar, a la destrucción del epitelio a consecuencia de la liberación de su contenido.

Macrófagos

Estas células tienen un papel similar a los neutrófilos, su actividad amebicida está dada por el reconocimiento de moléculas de la superficie del parásito como la lectina de *E. histolytica* y el lipopéptidofosfoglicano (EhLPPG) (ambas involucradas en adherencia), mediante los receptores TLR2 y TLR4, que induce la expresión de citocinas y quimiocinas como TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-10 en monocitos y macrófagos expuestos *in vitro* (Maldonado-Bernal y cols, 2005). El mediador amebicida más importante producido por los macrófagos es el óxido nítrico (NO) porque es capaz de inhibir importantes factores de virulencia de la amiba como las proteinasas de cisteína y la alcohol deshidrogenasa 2 (Siman-Tov y cols, 2003).

Por otra parte, está descrito que el parásito es capaz de suprimir el estallido respiratorio y reducir la producción de NO en macrófagos, este último mecanismo, mediado por la expresión de una arginasa de *E. histolytica* que compite con la óxido nítrico sintetasa (NOS) por la L-arginina convirtiéndola a L-ornitina (Elnekave y cols, 2003). Además, el parásito inhibe la expresión de CMH II (inducida por interferon (IFN) en macrófagos) lo que se traduce en el impedimento de su función como CPA (Wang y Chadee 1995), expresa PGE2 que es un inmunoregulator que eleva en nivel de AMPc, inhibiendo la vía de señalización por PKA, lo que se traduce en la inhibición de la expresión de citocinas Th1, del estallido oxidativo mediado por NADPH y la síntesis de NO (Wang y Chadee, 1995; Gutierrez-Alarcon y cols, 2006). Finalmente, el trofozoíto secreta el factor inhibidor de locomoción de monocitos (MLIF) que es un pentapéptido soluble con propiedades anti-inflamatorias demostrado para inhibir la expresión de NO (Rico y cols, 2003), quimiocinas pro-inflamatorias (Utrera-Barillas y cols, 2003) e IL-1 y favorece la expresión de IL-10 en T CD4⁺ (Rojas-Dotor y cols, 2006).

Mastocitos

El papel de los mastocitos en infecciones intestinales producidas por bacterias y algunos parásitos, indican que estos participan de manera esencial en la eliminación de dichos microorganismos (Velin D y cols, 2005). Sin embargo, actualmente no se conoce su papel en la respuesta inmune ante *E. histolytica* (Haupt y cols, 2002).

Complemento

Una vez que el parásito atraviesa la barrera epitelial, se expone a los componentes del plasma, entre ellos, al complemento que potencialmente puede destruirlo. Sin embargo, el trofozoíto de *E. histolytica* es resistente al complemento, dicha resistencia parece estar mediada por la acción de cisteinproteasas (CPs), que a pesar de ser capaces de activar la vía alternativa del complemento al transformar C3 en C3b (Reed y cols, 1989), inactivan las anafilotoxinas C3a y C5a al degradarlas (Reed y cols, 1995).

Por otra parte, la lectina de *E. histolytica* tiene epítopes que mimetizan a proteínas inhibitoras del complemento, como CD59, que evita la deposición del complejo de ataque a la membrana (Braga y cols, 1992, Ventura-Juárez, 2009). Mientras que el lipopéptidoglicano de *E. histolytica* (EhLPG) y el lipofosfopeptidoglicano de *E. histolytica* (EhLPPG), moléculas de superficie del trofozoíto ancladas a la membrana por glicosil fosfatidil inositol (GPI), forman una capa gruesa en la superficie que impiden el contacto de los mediadores del complemento con la superficie del parásito (Maldonado-Bernal y cols, 2005; Lotter y cols, 2009).

Células NK y NKT

Esta población celular tiene un papel fundamental en la respuesta inmunológica efectiva contra la infección por *E. histolytica* y está relacionada con la expresión de IFN γ y de péptidos citolíticos. Al igual que en otros procesos infecciosos, el IFN γ producido por NKs y linfocitos activa neutrófilos y macrófagos *in vitro* estimulando en ellos el estallido respiratorio y la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que confiere a estas células la denominación de amebicidas (Denis y Chadee, 1989; Lin y Chadee, 1992).

A pesar de lo descrito anteriormente, se ha sugerido que *E. histolytica* contribuye a la homeostasis del epitelio secretando componentes que inducen un estrés protector en las CEI incrementando su resistencia a apoptosis y suprimiendo la activación de macrófagos (Kammanadiminti y Chadee, 2006). Por otra parte, se postula que la IL-10 es indispensable para resistir la invasión por el parásito en el modelo de colitis amibiana en ratones C57BL/6 al ayudar a mantener la integridad de la barrera del epitelio intestinal (Hamano y cols, 2006).

Respuesta inmune adaptativa en amibiasis intestinal

La respuesta inmune humoral en mucosas, juega un papel preponderante en la protección ante agentes infecciosos, los anticuerpos IgA secretores (IgAs) neutralizan algunos microorganismos y sus toxinas, los opsonizan y facilitan el muestreo por células M (Haque y cols 2001 y 2006). En el caso de la amibiasis intestinal, se ha considerado que un componente importante de la respuesta inmune adaptativa son los anticuerpos IgAs anti-lectina de *E. histolytica*, debido a que estos son capaces de inhibir la adherencia de *E. histolytica* a mucinas, células epiteliales y células inmunes *in vitro* (Chadee y cols, 1987;

Ravdin y cols, 1988; Saffer y Petri, 1991; Carrero y cols, 1994; Huston y cols, 2003). De manera más particular, es preciso mencionar que anticuerpos dirigidos contra el dominio rico en carbohidratos (CDR) de la lectina de *E. histolytica* se encuentran en el 78% de los individuos asintomáticos (Lotter y cols, 1997). En este sentido, el papel protector de las IgAs en la amibiasis intestinal fue sugerido en un estudio prospectivo en Bangladesh, en donde se encontró una correlación entre la presencia de anticuerpos IgAs anti lectina de *E. histolytica* y la ausencia de reinfección intestinal por *E. histolytica* (Haque y cols, 2001, 2006), además, su presencia estuvo asociada a una rápida recuperación de AHA (Abd-Alla y cols, 2006). Por otra parte, anticuerpos IgA dirigidos contra la CRD de la lectina de *E. histolytica* mostraron conferir protección ante el reto cecal con *E. histolytica* (Haupt y cols, 2004; Carrero y cols, 2007).

Dentro de los mecanismos de evasión que tiene el trofozoíto en contra del sistema inmune adaptativo, está la expresión de cisteinproteasas (CPs), que como en el caso del mecanismo descrito ante el complemento, tienen la función de romper IgAs de isotipo 1 y 2 en mucosas e IgG séricos (Kelsally y Ravdin, 1993; Tran y col, 1998; García-Nieto, 2008; Macpherson, 2008).

Otro mecanismo de evasión inmune descrito es el “capping” de inmunoglobulinas y proteínas del complemento, el cual consiste en la movilización de receptores de trofozoítos unidos a estas proteínas hacia el segmento posterior del trofozoíto denominado “región uroide”, para finalmente liberar estos complejos en vesículas hacia el medio. Recientemente, se sabe que el “capping” no sucede en *E. dispar* y está directamente relacionado con su incapacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero y su baja patogenicidad (Chávez-Munguía y cols, 2012). Este mecanismo de “capping”, se lleva a

cabo por la EhROM1, una proteasa que tiene la función de formar, distribuir y liberar los cappings del trofozoíto y de cortar el dominio transmembranal de la subunidad pesada de la lectina de *E. histolytica*, permitiendo de esta manera al trofozoíto liberar de su superficie estas moléculas y escapar del sistema inmune.

Entamoeba histolytica y la infección hepática

Un apartado fundamental de este trabajo, es la relación huésped-parásito durante el desarrollo del AHA. Para comprender mejor dicha relación, a continuación se describirán brevemente las generalidades del hígado y la respuesta inmune específica de este órgano.

Anatomía, función y respuesta inmune del hígado

El hígado es una víscera maciza localizada casi en su totalidad en el hipocondrio derecho por debajo del diafragma. Dentro de sus múltiples funciones están la síntesis de proteínas plasmáticas, la detoxificación, secreción de bilis, el almacenaje de vitaminas y glucógeno y la producción de proteínas de fase aguda en caso de inflamación, trauma o neoplasia. Los hepatocitos, que son las principales células del parénquima hepático, están separados de la circulación sanguínea por una capa de células endoteliales fenestradas (LSEC) que carecen de uniones estrechas y de membrana basal, lo que permite el paso de partículas menores a 12 nm al espacio de Disse (DS). Células estrelladas se encuentran localizadas en el DS entre las LSEC y los hepatocitos. Otras poblaciones celulares localizadas en la luz del sinusoides hepático son células de la respuesta inmune como las CPAs, células de Kupffer (macrófagos ubicados en el área periportal), CDs (zona periportal

y pericentrales), células NK, células NKT y linfocitos T y B (Figura 6) (Santi-Roca y cols, 2009; Thomson y Knolle, 2010).

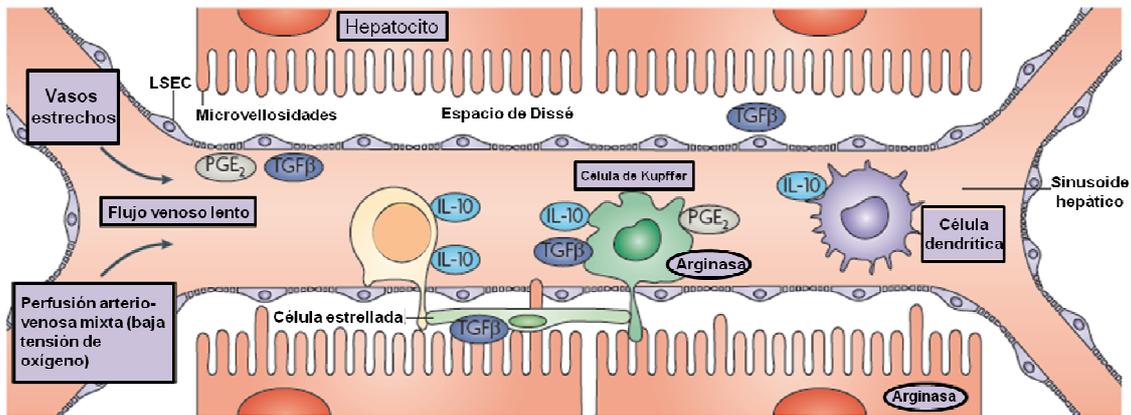


Figura 6. Localización anatómica de células de la respuesta inmune en el sinusoide hepático. Tomado de Nature Reviews Immunology 2010.

Diversos mecanismos de regulación inmunológica, como los que se encuentran en el intestino, imperan en este órgano debido a que se encuentra en constante exposición a antígenos de la dieta, productos bacterianos, células dañadas y sustancias tóxicas, entre otros. Como se puede observar en la figura 6, existe una expresión constitutiva de mediadores como la IL-10, TGFβ, arginasa y PGE₂ por células de la respuesta inmune y del parénquima hepático (Thomson y Knolle, 2010). Este ambiente “regulador” impide el desarrollo de una respuesta inflamatoria que podría ocasionar daño en el parénquima hepático ante estímulos inocuos, o incluso ante estímulos que despierten una respuesta inmune efectiva. En este sentido, otro aspecto fundamental en la tolerogénesis de este órgano, es que el encuentro de los linfocitos T vírgenes con el antígeno se lleva a cabo en el hígado y no en tejido linfoide como sucede en otros órganos. Esto permite que el ambiente “regulador” favorezca la activación de células Treg con la consecuente expresión de IL-10 y TGFβ, que refuerzan la modulación de la respuesta inflamatoria producida por células de

la respuesta inmune innata ante antígenos reconocidos a través de los PRRs (Thomson y Knolle, 2010).

Absceso hepático amibiano

Durante el paso de los trofozoítos en el torrente circulatorio por la vena porta, éstos se enfrentan a una presión parcial de oxígeno de 98% (superior a la de la luz intestinal) y al estallido respiratorio de células fagocíticas con la consecuente formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Para sobrevivir a este ambiente, el trofozoíto cuenta con mecanismos de evasión de descritos anteriormente y resumidos en la tabla 3.

Una vez superado el paso por la vena porta, la amiba encuentra condiciones favorables para su adhesión y migración al parénquima hepático. Una de ellas es la baja velocidad del flujo sanguíneo en el sinusoides hepático de 3.4 ± 0.16 ml/min (Santi-Roca y cols, 2009), lo que permite al parásito adherirse a células endoteliales sinusoidales y eventualmente migrar hacia el parénquima. Los mecanismos involucrados en este proceso no se conocen con precisión; sin embargo, se ha sugerido la participación de algunos eventos como son: la apoptosis de LSEC y el inicio del proceso inflamatorio (ambos inducidos por la lectina de *E. histolytica* en el modelo de AHA en hámster) (Rigothier y cols, 2002; Blazquez y cols, 2007), la actividad no proteolítica de EhCP5 (Mortimer y Chadee, 2010) y de una proteína de 140 kDa denominada EhFNR (una molécula parecida a la $\beta 1$ -integrina) (Hernández-Ramírez y cols, 2007) que actúan como adhesinas. Los procesos mencionados anteriormente, marcan la pauta de los mecanismos hasta ahora descritos en la invasión de *E. histolytica* al parénquima hepático y el inicio en el desarrollo del AHA.

En etapas iniciales del desarrollo del AHA, la infiltración de neutrófilos en el parénquima hepático es el primer evento documentado. Estas células tienen un papel tan controversial como en la amibiasis intestinal, ya que se considera que la degranulación de esta célula por sí misma, ocasiona la destrucción del parénquima hepático (Salata y Ravdin, 1986). Sin embargo, en un modelo de AHA en ratones SCID, se demostró que ratones neutropénicos son más susceptibles a desarrollar grandes abscesos hepáticos que los ratones SCID control (Seydel y cols, 1997). Este hallazgo apoya la noción de que la capacidad amebicida de los neutrófilos participa de manera activa en la eliminación inicial del parásito y por lo tanto, representa la primera barrera inmunológica de defensa en el parénquima hepático durante el desarrollo del AHA.

Posteriormente, los macrófagos reclutados y activados por la vía clásica expresan $IFN\gamma$ e iNOS, lo que limita el crecimiento del absceso y está relacionado con una respuesta protectora. Sin esta activación, los parásitos no son eliminados totalmente y los sobrevivientes se multiplican rápidamente produciendo la expansión de los focos inflamatorios por todo el parénquima hepático (Rigothier y cols, 2002). Por otra parte, se documentó que los macrófagos pueden ser activados alternativamente debido al predominio de expresión de citocinas tipo Th2 como IL-4 e IL-13 en la infección crónica por *E. histolytica* (Mortimer y Chadde, 2010), perdiendo entonces su capacidad amebicida. Durante esta etapa, los abscesos están constituidos por un centro necrótico, rodeado de infiltrado inflamatorio constituido por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos. Los trofozoítos se agregan en la pared interna del granuloma y escapan del mismo hacia el tejido adyacente para formar múltiples granulomas que se fusionan y forman extensas lesiones necróticas en la totalidad del órgano (Chadee y Meerovith, 1985).

Por otra parte, el desarrollo del AHA en hámster, la amiba expresa e induce la expresión de PGE₂ en leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos activados, inhibiendo en ellos la expresión de citocinas pro-inflamatorias y del CMH II, interfiriendo así con la activación celular y la presentación antigénica (Harizi y cols, 2001).

Otra población celular estudiada en el desarrollo del AHA son las células NKT. Estas células tienen un papel central en la coordinación de la respuesta inmune y la destrucción masiva de trofozoítos en etapas iniciales de la infección. Esta población es activada por glicolípidos presentados en moléculas CD1d (Crispe, 2009) y al ser activadas expresan IFN γ , IL-4, IL-10 e IL-13. De este modo, inician el proceso inflamatorio y dirigen la inmunidad adaptativa regulando así la eliminación del parásito en el parénquima hepático. Para demostrar el papel protector de estas células, Lotter y colaboradores utilizaron ratones deficientes de células T asesinas naturales con receptor invariante (iNKT) y encontraron que éstos desarrollaron abscesos hepáticos más extensos en comparación con ratones silvestres (Lotter y cols, 2009). Además, empleando el activador natural de las iNKT del trofozoíto de *E. histolytica*, el EhLPPG, demostraron que la activación de estas células es a través de CD1d, TLR2 y TLR4 y que dicha activación, estimuló la expresión de IFN γ en estas células, lo que se relacionó directamente con protección ante el reto de AHA en ratones C57BL/6 (Lotter y cols, 2009).

Por otra parte, en relación a la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T periféricos de pacientes recuperados de AHA son incapaces de proliferar ante el estímulo de mitógenos policlonales *in vitro* (Salata y cols, 1986). Posteriormente, se estudió en el modelo experimental de AHA en gerbo, en donde se demostró que el suero de estos animales infectados con AHA suprime selectivamente la proliferación de linfocitos T

mediante un mecanismo independiente de óxido nítrico y PGE2 pero dependiente de la expresión disminuida de IL-2.

Estos datos sugieren que en etapas iniciales del desarrollo del AHA, el trofozoíto de *E. histolytica* activa células de la respuesta inmune con capacidad amebicida como son los neutrófilos, macrófagos y células iNTK. Sin embargo, si estas células son incapaces de eliminar por completo al parásito, se establece una infección crónica en donde el trofozoíto induce: activación alternativa de macrófagos, supresión de linfocitos T efectores y activación de células Treg. Esta respuesta inducida por el parásito en la etapa crónica del AHA incapacita al sistema inmune para eliminar la infección y propicia la expansión de los abscesos en todo el parénquima hepático, llevando con ello a la muerte del hospedero y eventualmente del parásito.

Candidatos a vacuna contra amibiasis

Estudios en modelos experimentales (Zhang y Stanley, 1996; Houpt E y cols, 2004; Abd Alla y cols, 2004, 2007; Petri y cols, 2006) y de seguimiento en poblaciones endémicas para amibiasis (Haque y cols, 2001; Ali y cols, 2008), sugieren que la inducción de anticuerpos IgAs dirigidos contra algunas moléculas de superficie de la amiba pueden ser capaces de conferir protección contra amibiasis intestinal.

En estos ensayos se emplearon diversos adyuvantes para la vacunación parenteral y oral que no son permitidos para ser utilizados en el humano, tales como el adyuvante de Freund's, la toxina del cólera, la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, la subunidad B de la toxina del cólera, regiones de ADN ricas en citosina y guanina (CpGs), *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica* (Zhag y cols, 1994, 1996 y 1997; Mann, 1997;

Stanley, 1997; Lotter y cols, 2000, 2004; Houpt y cols, 2004; Ivory y Chadee, 2007). Por este motivo, la búsqueda de adyuvantes seguros para el uso en humano y capaces de inducir una respuesta inmune efectiva en mucosas contra *E. histolytica* continúa siendo de interés primordial para el posible desarrollo de una vacuna, atendiendo a la recomendación emitida por la OMS en el documento Iniciativa para la Investigación de Vacunas para enfermedades parasitarias.

Diversos candidatos antigénicos fueron propuestos para vacunación por diferentes grupos y la lectina de *E. histolytica* fue identificada como el principal candidato. Esta molécula es una adhesina con afinidad por galactosa y N-acetil-D-galactosamina que se encuentra anclada a la membrana del trofozoíto y está relacionada a múltiples mecanismos de virulencia del parásito como la adhesión (Ravdin y cols, 1985), citotoxicidad contacto-dependiente (Teixeira y Mann, 2002), fagocitosis (Sateriale y Huston, 2011) y enquistamiento (Aguilar-Díaz y cols, 2011). Se sabe además que la lectina de *E. histolytica* es capaz de activar la expresión de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos y células dendríticas *in vitro* (Ivory y Chadee, 2007). Esta molécula está formada por tres subunidades, la subunidad pesada de 170 kDa, que tiene un dominio transmembranal y un dominio rico en carbohidratos (CDR), la subunidad ligera de 31-35 kDa y una intermedia de 150kDa (Solaymani-Mohammadi y Petri, 2008) (Figura 7).

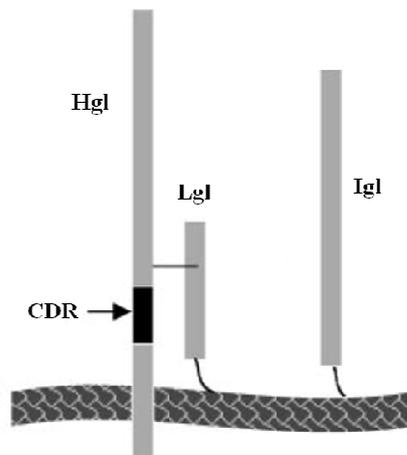


Figura 7. Modelo de la adhesina con afinidad por galactosa y N-acetil-D-galactosamina de *Entamoeba histolytica* (lectina de *E. histolytica*). El esquema muestra la subunidad pesada (Hgl) de 170kDa que contiene una región extracelular con dominio rico en carbohidratos (CDR), una región transmembrana y una región citoplasmática. La subunidad ligera (Lgl) está unida por un puente de disulfuro a la Hgl y la subunidad intermedia está asociada de manera no covalente al complejo HgL-Lgl. Tomado de Petri WA Jr y cols, 2002.

Múltiples estudios demostraron el potencial de la lectina de *E. histolytica* nativa o fracciones de esta para conferir protección contra el desarrollo del AHA en gerbos y hámsteres utilizando los adyuvantes descritos anteriormente (Zhang y cols, 1994; Soong y cols, 1995; Ivory y Chadee, 2006, 2007). Resultados similares fueron obtenidos con vectores atenuados de *Yersinia* y *Salmonella* (Mann y cols, 1997, Lotter y cols, 2008) e incluso por inmunización pasiva con anticuerpos IgG anti-lectina de *E. histolytica* (Cheng y cols, 1999).

Un fragmento de la subunidad pesada de la lectina de *E. histolytica* denominado LC3 (52kDa), que incluye el CRD (Soong y cols, 1995), también mostró ser uno de los principales blancos para los anticuerpos IgG e IgA anti-lectina de *E. histolytica* recuperados de suero y heces de pacientes, respectivamente (Abou-el-Magd y cols, 1996; Abd-Alla y cols, 2000, 2004,). La inmunización de ratones Balb/c y primates no humanos con LC3 y toxina colérica como adyuvante (vía oral y nasal), resultó en la producción de anticuerpos

anti-LC3 IgG séricos e IgAs; estos últimos, con capacidad de inhibir la adherencia de trofozoítos de *E. histolytica* a células de ovario de hámster chino (CHO) *in vitro* (Beving y cols, 1996, Abd-Alla y cols, 2007). Por otra parte, la inmunización intraperitoneal con la proteína LC3 recombinante empleando como adyuvante Titermax, demostró tener una eficacia de protección de 71% ante el reto de AHA en gerbos.

Otro candidato es la proteína rica en serinas de *E. histolytica* (SREHP) que se denominó así debido a la gran cantidad de residuos de serina que posee (52 de 233 aa). Estructuralmente, tiene una región hidrofóbica N-terminal (secuencia señal) que precede a una región de aa altamente cargados como lisina, ácido glutámico y ácido aspártico, esta última, es seguida de una región hidrofóbica de repeticiones en tándem de dodecapéptidos y octapéptidos compuestos de serina, ácido aspártico, treonina, prolina, lisina, ácido glutámico, asparagina y alanina. Finalmente, en el extremo C-terminal hay un dominio hidrofóbico y una región de inserción a la membrana (Figura 8). Otra característica distintiva de esta proteína son las modificaciones pos-traduccionales que incluyen fosforilación de residuos de serina y glicosilación con residuos de N-acetilglucosamina que son más comunes en proteínas nucleares y citosólicas (Stanley, 1997).

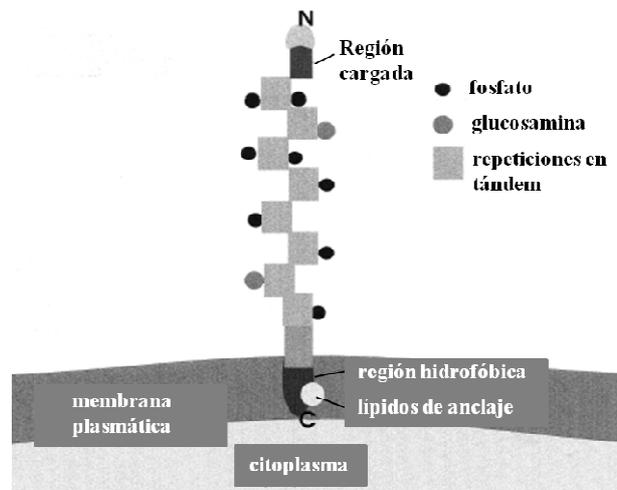


Figura 8. Modelo de SREHP. En este esquema se detallan las características estructurales de esta proteína: incluyendo, la región cargada de a.a., las repeticiones en tándem, las modificaciones posttraduccionales y el dominio hidrofóbico en el extremo C-terminal. Tomado de Stanley SI, Jr, 1997.

Esta proteína se expresa de manera abundante en la superficie del trofozoíto de *E. histolytica*, es altamente inmunogénica y tiene un alto número de epítomos conservados (Stanley, 1997). Además, recientemente se demostró que SREHP participa en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas (Teixeira y Huston, 2008); a pesar de estos hallazgos, aún no se le adjudica una función biológica específica a esta proteína.

Aproximadamente el 80% de sujetos que desarrollaron AHA tienen anticuerpos anti-SREHP séricos (Stanley y cols, 1991) y un gran porcentaje de pacientes con AI desarrollan anticuerpos IgAs recuperados de saliva (Carrero y cols, 1997). Ensayos *in vitro* demostraron que anticuerpos dirigidos contra esta proteína son capaces de bloquear la adherencia del trofozoíto a células de mamífero (Stanley y cols, 1990; Zhang y cols, 1994; Carrero y cols, 1997). Además, ensayos de inmunización pasiva con anticuerpos anti-SREHP (Zhang y cols, 1994) y de inmunización activa con la proteína SREHP como inmunógeno en: i) vacunas de ADN (Zhang y Stanley, 1999) fusionada al dominio A2 de la toxina colérica (Sultan y cols, 1998), ii) expresada en una cepa avirulenta de *Salmonella typhi* TY2 chi 4297 y en una cepa atenuada de *Salmonella typhi* (Zhang y Stanley 1996,

1997), fusionada a la subunidad B de la toxina de cólera (Zhang y cols 1995; Ryan y cols, 1997) y a una proteína de unión a maltosa (MBP) (Zhang y cols, 1994) demostraron ser capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular capaz de conferir protección ante el reto de AHA. Con base a estos reportes, la SREHP de *E. histolytica* se consideró como uno de los principales candidatos a vacunación contra el AHA (Stanley, 1997).

Otra proteína candidata para vacunación es la proteína de 29 kDa de *E. histolytica* denominada CREHP; su nombre lo debe a que su secuencia tiene 7% de residuos de cisteínas (Torian y cols, 1990). La comparación de su secuencia denota una estrecha relación con las proteínas responsables de inactivar el H₂O₂ de bacterias que viven en el intestino. Esta proteína es una alquil-hidroperóxido reductasa cuya localización en el trofozoíto no es aún determinada; sin embargo, se inmunolocalizó en citoplasma, núcleo y superficie celular (Torian y cols, 1990; Reed y cols, 1992; Flores y cols, 1993). Esta proteína se detectó como un antígeno inmunodominante reconocido por el 80% de los sueros de pacientes con AHA y por anticuerpos IgAs en saliva de pacientes con AI (Carrero y cols, 2000). Por este motivo, se estudió su utilidad en serodiagnóstico (Lee y cols, 2000), en ensayos de protección por inmunización intra-peritoneal de gerbos retados contra AHA (Soong y cols, 1995) y administrado por vía oral con toxina de cólera en el que demostró ser capaz de inducir la producción de anticuerpos IgAs capaces de conferir protección ante el reto de AI en ratón C3H/HeJ (Carrero y cols, 2010).

Como se describió previamente, antígenos como lectina de *E. histolytica* nativa o recombinante, fragmentos de su subunidad pesada como LC3 o LecA, la proteína rica en serina (SREHP), la proteína rica en Cisteínas (CRHP) y otros antígenos como la adhesina de 112 kDa (EhADH112) y una proteína de 30 kDa que pertenece a la familia de proteínas

de unión a colágeno, son capaces de conferir diferentes grados de protección contra el desarrollo de AHA en hámster y gerbo, sugiriendo una interacción funcional entre las mucosas y el sistema inmune sistémico (Zhang y cols, 1994; Soong y cols, 1995; Mann y cols 1997; Cheng y cols 1999; Gaucher y Chadde 2003; Ivory y Chadde, 2006, 2007; Lotter H y cols, 2008; Carrero y cols, 2010). En todos estos estudios, al igual que en los ensayos de protección contra amibiasis intestinal, se emplearon adyuvantes que están restringidos para su uso en humanos.

Finalmente, la OMS en el documento Iniciativa para la Investigación de Vacunas para enfermedades parasitarias (IVR por sus siglas en inglés), emitió la recomendación del desarrollo de una vacuna contra *E. histolytica* con base en los trabajos de epidemiología y vacunas que sugieren que anticuerpos IgAs contra la lectina de *E. histolytica*, son capaces de conferir resistencia a la reinfección intestinal con *E. histolytica*, y al hecho de que este antígeno demostró conferir protección ante el reto de absceso hepático amibiano experimental.

http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index1.html

Baculovirus

En busca de un vector viral con capacidad adyuvante para la administración oral de antígenos amibianos, utilizamos el baculovirus *Autographa Californica* múltiple nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). A continuación, se hará una breve descripción de las características generales de los baculovirus, de sus aplicaciones y del desarrollo de nuevas

estrategias en las que se pretende emplear como vector terapéutico para su uso en medicina humana y veterinaria.

Clasificación de la familia *baculoviridae*

El nombre de la familia *baculoviridae* proviene del Latín *baculum* que significa varilla o bastón para describir morfológicamente al virión. Hasta el momento, se conocen más de 600 especies que infectan principalmente a artrópodos del orden *lepidoptera* (mariposas y larvas) y pocas especies infectan al orden *Hymenoptera*, *Diptera* y algunos crustáceos (van Oers y Vlak, 2007; Chen CY y cols, 2011).

De manera general, los baculovirus son divididos en dos géneros, nucleopolyhedrovirus (NPVs) y granulovirus (GVs) de acuerdo a la estructura de los cuerpos de oclusión (OBs) o polihedra. Estos cuerpos, son acumulaciones de una matriz proteica localizados en las células infectadas durante la fase tardía de replicación viral. Los NPVs producen OBs visibles por microscopía de luz en el núcleo de las células infectadas (0.5-1.5 μm de diámetro) conteniendo numerosos viriones, mientras que los GVs, producen OBs de 0.16 a 0.5 μm que contienen un solo virión encapsulados en una proteína denominada granulina (Slack y cols, 2007).

Los virus de esta familia tienen un gran genoma circular de doble cadena de ADN que va de 80, 000 a 180, 000 pb, están envueltos por una bicapa lipídica y tienen un diámetro de 30-60 nm y un largo de 250 a 300 nm. Estos viriones están conformados por una o más nucleocápsides (NCs), constituidas principalmente de una proteína de 39 kDa denominada vp39 y otras proteínas como la P24, P78/83; esta última, localizada en los extremos terminales de las NC. Dentro de la NC, se encuentra una estructura denominada

centro o “core” constituido por una estructura formada por el ADN genómico y una proteína de 69 kDa (rica en arginina) denominada P6.9 (Slack y cols, 2007).

La proteína más abundante del virión libre (BV) es una glicoproteína denominada Gp64 (64 kDa) y consta de 511 aa, se localiza en el citoplasma de las células infectadas a partir de las 24 horas de infección y posteriormente, se concentra en trímeros en la membrana plasmática y es adquirida por el BV durante el proceso de gemación (Volkman y Goldsmith, 1981). La importancia funcional de esta proteína fue descrita en ensayos de neutralización, en donde se comprobó que es indispensable para la infección y durante el escape de las NCs del compartimento endosomal en células inmunes que se describirá posteriormente.

Ciclo de infección

Los baculovirus tienen un único ciclo de replicación bifásica en el que producen dos fenotipos virales: el BV y el virión derivado de la polihedra (PDV). El PDV se encuentra embebido en los OBs liberados de una larva infectada y contaminando el ambiente; al ser ingerido por otra larva, los PDVs son liberados en el ambiente alcalino del intestino del insecto (Granados y Lawler, 1981), siendo responsables de la infección primaria o transmisión horizontal (insecto-insecto). Una vez liberados en el lumen intestinal, los PDVs pasan a través de la membrana peritrófica e infectan exclusivamente células epiteliales columnares del intestino del insecto (Slack y Arif, 2007). En este sentido, se postula que la entrada de los PDV a las células intestinales ocurre por fusión de las membranas, involucrando la interacción entre moléculas aún no descritas. Las NCs son liberadas en el citoplasma y migran por un mecanismo dependiente de transporte del citoesqueleto y entra al núcleo por los poros nucleares (Xu y cols, 2007).

El virus se replica en las células epiteliales para dar lugar a los BVs, que son responsables de la infección secundaria o transmisión célula-célula y capaces de infectar cualquier célula del insecto (Ghosh y cols, 2002; Slack y cols, 2008) (Figura 9).

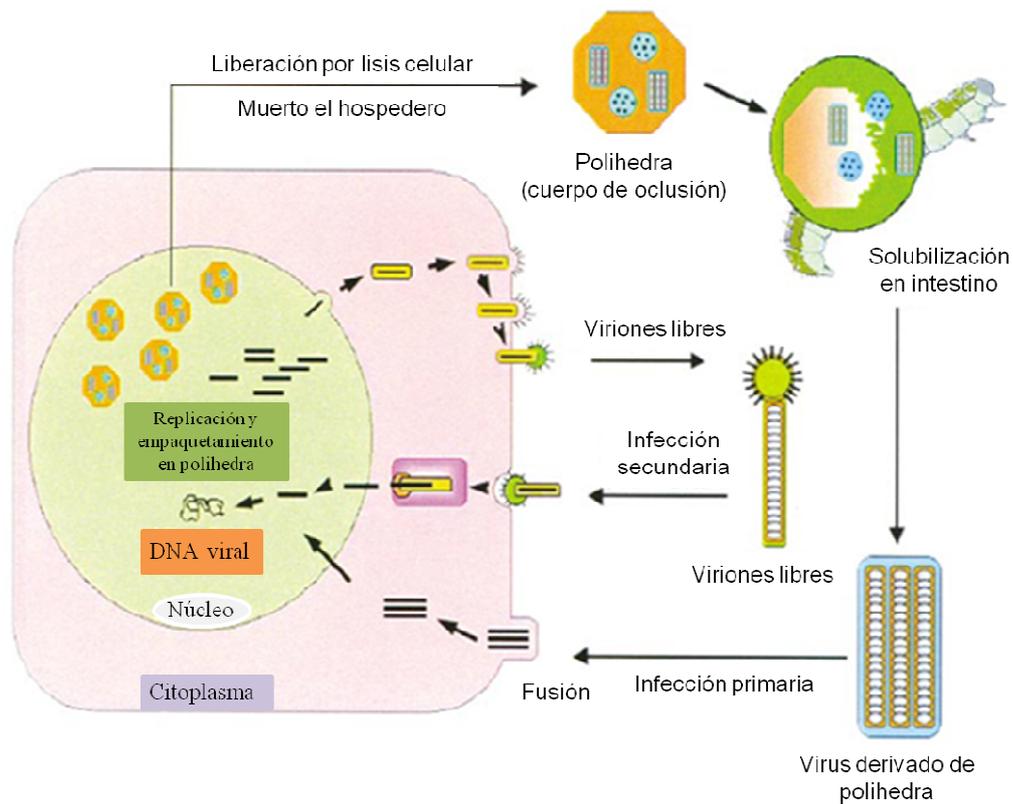


Figura 9. Ciclo de infección del baculovirus *Autographa Californica* (AcNPV). Tomado de Ghosh y cols, 2002

Baculovirus como herramienta biotecnológica

El uso de virus entomopatógenos como el baculovirus AcNPV, es una herramienta empleada en las últimas décadas para la producción de bioinsecticidas utilizados para el cuidado de granos de consumo humano y para la producción de proteínas recombinantes de

uso clínico en el sistema BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*). El empleo de este vector con ambos fines fue aprobado por la FDA (Food and drug administration) (Cox, 2012, Mena y Kamen, 2011), de tal manera que actualmente se comercializan proteínas recombinantes producidas en este sistema con fines terapéuticos, un ejemplo de ello es Cervarix, una de las dos vacunas aprobadas contra el virus del papiloma humano (VPH). Además, se encuentran en investigación preclínica, proteínas producidas en este sistema y que se pretenden utilizar como vacunas contra diversos virus (Hitchman y cols, 2009).

Por otra parte, los baculovirus tienen propiedades muy deseables como vectores ya que son incapaces de replicarse en células de mamífero, expresan genes bajo el control de promotores específicos de mamíferos (Hofmann y Strauss, 1998), puede transducir células que no se estén dividiendo (Chen y cols, 2011), se obtienen altos títulos al ser replicados en células de insecto y la infección no causa efectos citopáticos (Shoji y cols, 1997). Por lo descrito anteriormente, el baculovirus es un vector candidato para terapia génica, actualmente se conoce que es capaz de transducir líneas celulares de humano como células HepG2, HEK293, Vero E6, células endoteliales A549, Glioblastoma U373 y U251, Astroцитos, células madre mesenquimales de médula ósea, osteosarcoma SAOS-2 y células de primates no-humanos, roedores, conejos y peces entre otras (Chen y cols, 2011).

Además, el AcNPV mostró que posee una fuerte capacidad de adyuvante en mamíferos. En este sentido, estudios recientes demostraron que el baculovirus puede infectar macrófagos y células dendríticas y en estas últimas, es capaz de inducir su maduración fenotípica y funcional (*in vitro*). Esta activación, induce la producción de TNF α y las moléculas de superficie CD83, CD80, CD86, HLA-DR, y HLA-1 e incrementan la capacidad estimuladora de CDs a células T (Schutz y cols, 2006). El

mecanismo exacto de la maduración mediada por baculovirus no se conoce hasta el momento, pero su activación puede resultar de la interacción de los residuos de azúcar de la proteína Gp64 con el receptor de reconocimiento de carbohidratos como el receptor de manosa o alguno de los TLRs. Posteriormente, se reportó que la endocitosis del baculovirus es seguida por su reconocimiento a través del TLR9 (que une motivos CpG presentes con alta frecuencia en el genoma de AcNPV) y que la estimulación del baculovirus, ocurre a través de la vía MyD88 que induce la producción de las citocinas inflamatorias (TNF α , IL-6, IL-12 en la línea de macrófago murino RAW2647), aunque se sabe que también señala a través de una vía independiente de MyD88/TLR9 que culmina en la producción de interferones (IFNs) (Abe y cols, 2005, 2010).

Finalmente, el estudio de la capacidad adyuvante de estos vectores, numerosos estudios demostraron que baculovirus recombinantes que expresan antígenos blanco en su superficie (baculovirus display) (Oker-Blom y cols, 2003) y/o conducen su expresión de manera dependiente a un promotor heterólogo como el promotor de citomegalovirus (CMV) denominados baculovirus de expresión (Yoshida y cols, 2009), son capaces de conferir protección contra una amplia variedad de patógenos. La protección inmune efectiva reportada hasta el momento en modelos murinos con uno o ambos sistemas para varias enfermedades virales y parasitarias, para vías de administración oral, nasal e intramuscular (Kaba y cols, 2003; Rahman y cols, 2003; Yoshida y cols, 2003, 2009, 2010; Feng y cols, 2006; Hervas-Stubbs y cols, 2007; Strauss y cols, 2007; Peralta y cols, 2007; Prabakaran y cols, 2008, 2010; Wu y cols, 2009). En estos ensayos, se demostró además, que los baculovirus recombinantes son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular antígeno-específica contra el antígeno co-administrado.

Planteamiento del problema

La amibiasis es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo y su forma clínica más común, la amibiasis intestinal, es la novena causa de consulta en la atención de primer nivel en nuestro país. Por esta razón, la OMS emitió la recomendación en el desarrollo de vacunas contra *E. histolytica*. En este sentido, numerosos grupos de investigación se han enfocado en buscar blancos antigénicos para vacunación que sean capaces de conferir protección ante el reto de amibiasis en modelos experimentales. El principal candidato antigénico para vacunación es la lectina de *E. histolytica* y en particular, la región denominada LC3 debido a la protección conferida ante el reto de amibiasis experimental (intestinal y hepática) en el modelo murino. Adicionalmente, estudios epidemiológicos en zonas endémicas sugieren que la presencia de anticuerpos IgAs dirigidos contra la lectina de *E. histolytica* son capaces de conferir protección ante la reinfección intestinal, lo que apoya la noción de que la lectina de *E. histolytica* es uno de los antígenos vacunales de interés para prevenir la enfermedad. Sin embargo, actualmente no se cuenta con un adyuvante seguro para su empleo en humano, por lo que nosotros proponemos el empleo de baculovirus recombinantes como vector para presentar este antígeno vacunal considerando las propiedades adyuvantes que propician su fácil y económica producción y la bioseguridad de su producción y venta.

Hipótesis

La inmunización por vía oral, nasal e intramuscular con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 sin adyuvante, es capaz de conferir protección ante el reto de absceso hepático amibiano en hámster.

Objetivo general

Inducir protección contra amibiasis hepática por inmunización oral, nasal e intramuscular con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3.

Objetivos particulares

- ✚ Generar un baculovirus recombinante que dirija la expresión del fragmento LC3 de la lectina de *Entamoeba histolytica* (AcNPV-LC3).
- ✚ Determinar la capacidad inmunogénica del baculovirus AcNPV-LC3 administrado por vía oral, nasal e intramuscular sin adyuvante en ratones y hámsteres.
- ✚ Determinar el grado de protección que confiere la inmunización con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 ante el reto de absceso hepático amibiano en hámster.
- ✚ Caracterizar la respuesta inmune asociada a la protección.

Materiales y métodos

Células y cultivos

Trofozoítos de la cepa HM1-IMSS se mantuvieron en medio TYI-S33 suplementado con 10% de suero bovino adulto (Biofluids International Inc., MD, USA) y 3% de una mezcla de vitaminas Diamond (JRH Biosciences, Kansas, USA) en condiciones anaeróbicas a 37°C.

Para mantener la virulencia de los trofozoítos, se realizaron pases sucesivos en hígado de hámster. En breve, después de la inyección de 1×10^6 trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en vena porta, a los 7 días se extrajo el órgano y se colectó en una caja petri estéril con la finalidad de seleccionar los lóbulos con mayor cantidad de abscesos, los cuales, se disecaron y maceraron hasta homogenizar el tejido. El homogenizado se colocó en cajas de cultivo con 4 ml de medio TYI-S-33 suplementado y 10µl de un coctel de antibióticos con; bencilpenicilina sódica cristalina 1×10^6 unidades, estreptomycinina 1g y amikacina 1g en 2 ml y se incubó durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se cosechó el paquete celular y se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente, este procedimiento se realizó sucesivamente durante 4 días. Los trofozoítos axenizados a partir de AHA con la técnica descrita anteriormente, se utilizaron para el reto de amibiasis hepática experimental en todos los ensayos de este trabajo (Trofozoítos y técnica proporcionada por Mario Nequiz de La Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM).

Células de insecto sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen, San Diego, CA) se cultivaron en monocapa o suspensión en medio Grace's (Invitrogen, USA) suplementado

con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/ml) y 0,1% ácido plurónico F-68 (Invitrogen, USA). Los cultivos se mantuvieron a 27°C en condiciones anaeróbicas; los cultivos en suspensión se mantuvieron además en agitación constante a 100 rpm.

Células HepG2 de ATCC se cultivaron en medio DMEM + L-glutamine (Invitrogen, USA) suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (Invitrogen, USA) y mantenidas a 37°C con 5% CO₂ y 95% de humedad.

Producción de baculovirus recombinantes de expresión AcNPV-LC3, AcNPV-CREHP y AcNPV-SREHP

Para producir los baculovirus recombinantes de expresión, la región codificante de LC3 [un fragmento de 354 aa de la subunidad pesada de la lectina de *E. histolytica* (Soong y cols, 1995)], de CREHP (233 aa) y de SREHP (233aa) (Stanley SL Jr, 1997), fueron amplificados a partir de ADN de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS utilizando los siguiente oligonucleótidos: para LC3, oligonucleótido sentido con sitio de restricción HindIII FLC3HCMV (5' TAGAAAGCTTATGTGTTCTAGTTTAAACATGTCCA-3') y oligonucleótido antisentido con sitio de restricción XbaI RSLC3XCMV (5' TTTTCTAGATTAACATGTTTTCTTTGTGTAAATAG 3'); para CREHP, oligonucleótido sentido con sitio de restricción HindIII FCRHCMV (5' TAGAAAGCTTATGTCTTGCAATCAACAAAAGAG 3') y oligonucleótido antisentido con sitio de restricción XbaI RSCRXCMV (5' TTTTCTAGATTAATGTGCTGTAAATATTCTTAATTC 3') y para SREHP, oligonucleótido sentido con sitio de restricción KpnI FSRKCMV (5'

TAGAGGTACCATGTTTCGCATTTTTATTGTTTATTG 3') y oligonucleótido antisentido con sitio de restricción XbaI RSSRXXCMV (5' TTTTCTAGATTAGAAGATGATAGCTATAATGATAG 3'). Los productos de PCR fueron clonados en los sitios Hind III/XbaI del plásmido pBlueCMV por separado, para generar las construcciones pBlueCMV-LC3 y pBlueCMV-CREHP y en los sitios KpnI/XbaI para la construcción pBlueCMV-SREHP. Los productos LC3, CREHP y SERHP se confirmaron por secuenciación en un secuenciador automático ABI-Prism 310. Los baculovirus recombinantes de expresión AcNPV-LC3, AcNPV-CREHP y AcNPV-SREHP fueron generados por recombinación homóloga entre el plásmido de transferencia pBlueCMV y el ADN linearizado de AcNPV de acuerdo a las instrucciones del fabricante del Kit Bac-N-Blue Transfection (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, se aisló ADN viral de las clonas cultivos con sobrenadante positivo con fenol cloroformo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La presencia de los fragmentos LC3, CREHP y SREHP se confirmó por amplificación mediante PCR y por secuenciación.

Producción de baculovirus recombinantes de despliegue AcNPVdisplay-LC3, AcNPVdisplay-CERHP y AcNPVdisplay-SERHP

Para la producción de los baculovirus recombinantes de despliegue, AcNPVdisplay-LC3, AcNPVdisplay-CERHP y AcNPVdisplay-SERHP, se amplificó a partir de ADN de *E. histolytica* la región codificante de LC3, CREHP y SERHP con los siguientes oligonucleótidos con sitios de restricción EcoRI/SalI: para LC3, oligonucleótido sentido FLC3E (5' TAGAGAATTCTGTTCTAGTTTAACATGTCC 3') y oligonucleótido antisentido RNSLC3Sal (5' TTTTGTGCGACACATGTTTTCTTTGTGTAAATAG 3'); para CREHP, oligonucleótido sentido FCREHP (5' TAGAGAATTCATGTCTTGCAATCAACAAAAAGAG

3') y oligonucleótido antisentido RNSCRSal (5'TTTTGTGCGACATGTGCTGTAAATATTTCTTAATTC 3') y para SREHP, el oligonucleótido sentido FSRE (5'ATGAGAATTCATGTTTCGCATTTTTATTGTTTATTG 3') y oligonucleótido antisentido RNSSRSal (5'TTTTGTGCGACGAAGATGATAGCTATAATGATAG 3'). Los productos de PCR se clonaron en los sitios EcoRI/SalI del plásmido pGP64display (proporcionado por Agustín Luz Madrigal, Departamento de Fisiología Celular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por separado, para generar las construcciones pGP64display-LC3, pGP64display-CREHP y pGP64display-SREHP; de esta manera, los segmentos génicos de los antígenos amibianos mencionados se clonaron en marco de lectura abierto con el gen de la proteína GP64, dando lugar a los cassettes GP64-LC3, GP64-CREHP y GP64SREHP que posteriormente se cortaron y se ligaron en los sitios Sac I/Kpn I del plásmido de transferencia pBlueBac4.

Recombinación homóloga entre el plásmido de transferencia y ADN de AcNPV en células sf9

Para realizar la co-transfección se utilizaron 0.1 µg del plásmido de transferencia (pBlueCMV o pBlueBac4.), 0.1 µg de ADN genómico de AcNPV (Bac-N-Blue) y 6 µg de Cellfectin Reagent en 200 µl de medio Grace's; previa agitación, se incubó la mezcla por 30 minutos a t.a. Por otra parte, 1×10^6 células sf9 cultivadas en cajas de 35mm, en 350 µl de medio Grace's no suplementado, fueron incubadas con la mezcla de transfección previamente descrita durante 3 h a 27°C. Pasada dicha incubación, se agregó 1 ml de medio Grace's suplementado y se dejó a 27°C en condiciones anaerobias durante 5 días. El sobrenadante de este cultivo celular es el stock viral de transfección.

Selección de clonas recombinantes a partir de ensayo de placa lítica y titulación

Se cultivaron 2×10^6 células/pozo de la línea sf9 en cajas de cultivo de 6 pozos en medio Grace's y se incubaron a 27°C en movimiento durante 30 minutos para distribuir homogéneamente la monocapa celular. Durante este tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas a partir del stock viral de transfección en $500 \mu\text{l}$ de medio Grace's (10^{-8} a 10^{-3}) que se agregaron a cada pozo de la placa de cultivo y posteriormente, se incubó durante 1 h a t.a con agitación suave, con la finalidad de favorecer la infección. Pasado este tiempo, el inóculo viral que no infectó el cultivo celular y contenido en el sobrenadante se retiró y se agregó a cada pozo 2 ml de una mezcla de agarosa (SeaPlaque GTG Agarose FMC Bio Products, USA) al 1.5 % y medio Grace's en una relación 1:1 vol/vol. La placa se incubó a t.a durante 20 minutos para permitir su solidificación y se agregó 1 ml de medio Grace's suplementado. Finalmente, la placa se incubó a 27°C en condiciones anaeróbicas durante 5 días y durante este tiempo se observó la placa por microscopía de luz para identificar las zonas líticas y la presencia o ausencia de polihedra. Dado que la expresión de esta proteína indica la presencia de baculovirus silvestre (AcNPV-WT), es necesario aislar placas líticas libres de polihedra a través de sucesivos ensayos de placa para finalmente obtener clonas de baculovirus recombinantes puros. Adicionalmente, debido a que la reconstitución del gen de *lacZ* en los baculovirus recombinantes se manifiesta por la actividad de la β -galactosidasa, se agregó a cada pozo X-gal a una concentración final de $150 \mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C durante 24 horas. La coloración azul en las placas líticas indicó la infección y replicación de baculovirus recombinantes.

La titulación de los baculovirus recombinantes se realizó mediante el ensayo de placa lítica descrito anteriormente y el título se determinó con la siguiente fórmula:

$UFP/ml = (1/dilución) (\# \text{ placas}) (1/ml \text{ utilizados para el ensayo})$

en donde la **dilución** se refiere a la utilizada en el pozo en estudio

el **# de placas** es igual a las placas recombinantes (X-gal positivas) en el pozo en estudio.

ml utilizados para el ensayo, son los ml tomados a partir del stock viral de transfección.

Por otra parte, las clonas de baculovirus recombinantes positivas a X-gal se amplificaron en cultivo de células sf9 por separado y a partir del sobrenadante se extrajo ADN por el método de fenol-cloroformo, con las recomendaciones del fabricante Bac-N-Blue Transfection Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Amplificación y purificación del baculovirus recombinante AcNPV-LC3

Los baculovirus recombinantes AcNPV-LC3 se amplificaron infectando células sf9 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. Los viriones se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo a 6 días de la infección, separando el detritus celular por centrifugación a 6,000 g durante 15 min a 4°C. Los baculovirus contenidos en el sobrenadante se concentraron por centrifugación en un rotor SW28 (Beckman) a 141,000 g a 4°C durante 90 min, después se resuspendieron en PBS y se purificaron por un gradiente de sacarosa al 10–50% (wt/vol), centrifugando de la forma descrita anteriormente. Finalmente, el virus contenido en la interfase fue recolectado y centrifugado en las condiciones ya mencionadas; el pellet formado por las partículas virales purificadas se guardó a 4°C protegidos de la luz. El baculovirus silvestre (AcNPV-WT) fue amplificado siguiendo el mismo protocolo.

Transducción de células HepG2 con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 y determinación de la expresión de LC3 por Western blot

La transducción de la línea tumoral hepática HepG2 (1×10^5) se realizó con AcNPV-LC3 a una MOI de 0.1 y se evaluó la expresión de LC3 por Western blot en extractos celulares obtenidos a 48 h de la transducción. En breve, 50 μg /carril de extracto total de células se corrieron en condiciones desnaturalizantes en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis. Las membranas fueron bloqueadas con 3% de BSA durante 2 hrs a t.a e incubadas con un antisuero anti-lectina de *E. histolytica* (subunidad pesada) policlonal de conejo (proporcionado por Rosario López, de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) durante 1 h a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween 20, la membrana se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Zymed laboratories, San Francisco, CA. USA) durante 1 h a 37°C. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces y los complejos inmunes se revelaron por quimioluminiscencia usando el Kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare). Los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1:1000.

Protocolos de inmunización con AcNPV-LC3, sangría y reto intra-portal con *E. histolytica*

Hámsteres machos Syrian golden (*Mesocricetus auratus*) de 4 a 6 semanas de edad se mantuvieron en condiciones libres de patógenos con agua y alimento *ad libitum*, siguiendo un protocolo aprobado por la comisión para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales se dividieron en 8 grupos de hámsteres: dos grupos no tratados (grupos sham no infectados e infectados) y

seis grupos inmunizados. Los grupos inmunizados comprenden: dos inmunizados por vía oral, uno con baculovirus WT (O AcNPV-WT) y el otro con baculovirus recombinantes LC3 (O AcNPV-LC3), dos grupos inmunizados por vía nasal, uno con baculovirus WT (N AcNPV-WT) y el otro con baculovirus recombinantes LC3 (N AcNPV-LC3) y dos grupos inmunizados por vía intra-muscular, uno con baculovirus WT (IM AcNPV-WT) y el otro con baculovirus recombinantes LC3 (IM AcNPV-LC3) (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos de inmunización y vías de administración

Vía de administración	Baculovirus silvestre AcNPV-WT	Baculovirus recombinante AcNPV-LC3	Sham infectado	Sham sin-infectar
Nasal (N)	N AcNPV-WT (14)*	N AcNPV-LC3 (19)*	PBS y NaHCO ₃ (29)*	PBS y NaHCO ₃ (9)*
Oral (O)	O AcNPV-WT (19)*	O AcNPV-LC3 (19)*		
Intra-muscular (IM)	IM AcNPV-WT (20)*	IM AcNPV-LC3 (20)*		

*Número de hámsteres

Los hámsteres de los grupos inmunizados, recibieron tres dosis de 1×10^8 PFU de AcNPV-LC3 a intervalos de dos semanas; la administración de los baculovirus recombinantes se realizó con el vehículo 200 μ l de 0.2M NaHCO₃ a un pH 8.3 para la vía oral y 20 y 50 μ l de PBS pH 7.4 para la vía nasal e intramuscular respectivamente (Fig. 10). Para la inmunización oral, previa sedación con Sevorane, se utilizó una sonda de alimentación neonatal a través de la cual se administró la dosis señalada previamente vía intra-gástrica. Por otra parte, para la inmunización nasal se colocaron 10 μ l en cada nostril con una micropipeta y para la vía intramuscular, se inyectó 50 μ l en el muslo derecho. Todos los animales de los grupos sham recibieron 200 μ l de NaHCO₃ vía oral y 20 y 50 μ l de PBS vía nasal e intramuscular, respectivamente. Dos semanas después de la última inmunización, todos los animales excepto el grupo sham no infectado, se retaron

inoculando vía intra-portal trofozoítos virulentos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS. En breve, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg; Anestestal, Pfizer). Una vez en anestesia quirúrgica, se realizó laparotomía en condiciones asépticas para exponer la vena porta en donde se inyectaron 10^6 trofozoítos en 100 μ l de PBS. El sitio de la inyección fue inmediatamente ocluido con una almohadilla de gel foam, las asas intestinales se regresaron a la cavidad abdominal y se cerró la pared con grapas quirúrgicas (Reflex 9, USA).

Se colectaron muestras de sangre antes del tratamiento (día 0), previo al reto (día 35) y antes del sacrificio (día 49); de éstas muestras, se obtuvo el suero por centrifugación y se almacenó a -70°C hasta su uso.

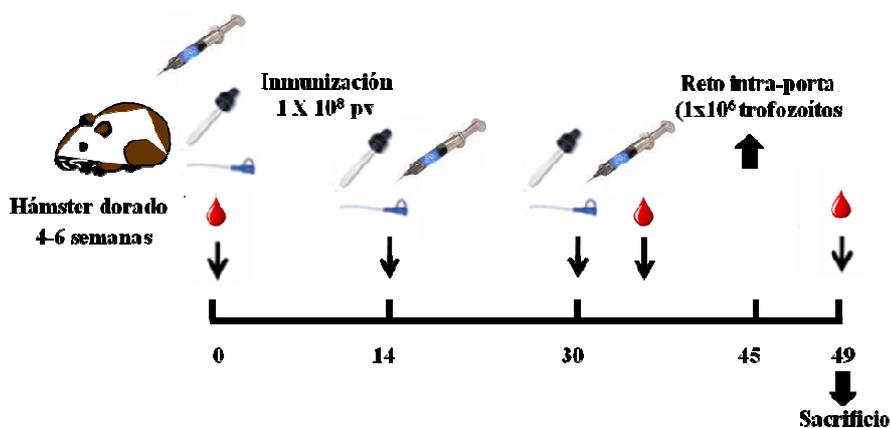


Figura 10. Esquema de inmunización, sangría, reto y sacrificio. Se inmunizo en tres ocasiones hamsters machos con 1×10^8 partículas virales cada 14 días. Además, al tiempo 0, 35 y 49 se tomó sangre por punción retro-ocular para recuperar el suero y determinar en él la respuesta inmune humoral y evaluar la función hepática. El reto se realizó a los 45 días inoculando trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en vena porta y se sacrificaron los animales siete días después del reto para evaluar el grado de protección conferido por la inmunización.

Siete días después del reto, los hamsters se sacrificaron bajo sobredosis anestésica y el hígado fue extirpado para evaluar características macroscópicas como peso, distribución y tamaño de los abscesos producidos por la infección con trofozoítos de *E. histolytica*. Se realizaron cortes coronales de la totalidad del órgano y un fragmento del

mismo se fijó en formaldehído-PBS al 4% durante 24 horas. Posteriormente, estos fragmentos se pasaron en sacarosa a concentraciones crecientes del 10 al 30% para crioproteger el tejido y posteriormente, se incluyeron en Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems) para obtener secciones de 10 μm para su tinción con Hematoxilina-Eosina. A partir de la observación macroscópica y microscópica de los hígados, se determinó el grado de protección conferida por la inmunización y se clasificó de la siguiente manera: i) protección total, para los hígados en los que no se encontró evidencia de absceso hepático, ii) protección parcial, para la presencia de lesiones $\leq 20\%$ de la totalidad del órgano e iii) infectados, para los hígados que desarrollaron abscesos en $\geq 21\%$ de la totalidad del órgano.

ELISA

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas durante 12 horas con 500 ng/pozo de extracto total de trofozoítos axénicos de *E. histolytica* obtenido mediante la técnica de calor-enfriamiento en buffer de carbonatos, pH 9.6 a 4°C. Después de bloquear con 1% BSA-Tween 20, se agregó a los pozos el suero de hámster diluido en 1% de BSA (dilución 1:50) y se incubó durante 1 h a 37°C. Después se eliminó el exceso con buffer PBS-Tween 20, se añadió a cada pozo anticuerpo anti-IgG de hámster conjugado a HRP (Becton Dickinson, USA) (dilución 1:1000) y se incubó por 1 h a 37 °C, posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20. Finalmente, los complejos antígeno-anticuerpo se revelaron con OPD y se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro.

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas durante 12 horas con el anticuerpo de captura anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12 y anti-IFN γ de ratón (BioLegend, USA) (dilución 1:200) en solución de sensibilización (8.4 g NaHCO₃, 3.56 g Na₂CO₃/L pH 9.5) a 4°C. Se

realizaron 4 lavados con 300 μ l/pozo de solución de lavado (PBS + 0.05% Tween 20), se bloqueó la unión inespecífica con 200 μ l/pozo de solución diluyente (PBS + 10% de suero bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación de 200 rpm; pasado este tiempo, se realizaron 4 lavados como se describió previamente. Después de eliminar por completo los residuos de la solución de lavado de las placas, se agregó 50 μ g/pozo de extracto soluble de hígado obtenido por sonicación en 100 μ l de solución diluyente; además, en cada placa se corrió una curva estándar de calibración preparada con diluciones seriadas de 125 a 2 pg/ml para IL-4, 1000 a 31.3 pg/ml para I-10, 250 a 7.8 pg/ml para IL-12 y de 500 a 15.6 pg/ml para IFN γ en solución diluyente y se incubó por 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo, se realizaron nuevamente 4 lavados y se agregó el anticuerpo de detección anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12 y anti-IFN γ de ratón (BioLegend, USA) (dilución 1:200) en 100 μ l/pozo de solución diluyente y la placa se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se lavó la placa en 4 ocasiones y se agregó 100 μ l/pozo de Avidina-HRP en solución diluyente (dilución 1:1000) (BioLegend, USA) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se lavó nuevamente la placa 5 veces y se agregó 100 μ l/pozo de la solución substrato TMB (BioLegend, USA), la placa se incubó protegida de la luz 30 minutos a temperatura ambiente en agitación y pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 650 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicados.

Ensayo de proliferación celular

Después del sacrificio a los 7 días del reto, se extirparon los bazos de todos los animales y se colocaron en una caja de cultivo de 24 pozos en 2 ml de medio RPMI. La

fracción celular fue obtenida por perfusión del órgano con una malla fina en condiciones de esterilidad y recolectada en tubos falcon de 15ml. Para eliminar los eritrocitos de la suspensión celular, se agregaron 2 ml de solución de lisis (0.1 g de KHCO_3 , 0.83 g de NH_4Cl y 0.0035 g de EDTA a pH 7.4 en 100 ml de H_2O bi-destilada) y se incubó a t.a durante 5 minutos. Al término de este tiempo, se agregaron 3 ml de medio RPMI suplementado para parar la reacción; se centrifugó a 2000 rpm a 4 °C durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Para retirar los restos de la solución de lisis, se lavó el pellet con 3 ml de medio RPMI en tres ocasiones. Las células restantes, linfocitos en su gran mayoría, se resuspendieron en 2 ml de medio RPMI suplementado y se contaron en cámara de Neubauer. Posteriormente, se lavaron las células 3 veces en PBS y el pellet se resuspendió en una relación de 1×10^6 células/ml de PBS-0.1% de BSA; posteriormente, se agregó 0.5 μM de CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit –C34554. Invitrogen, USA) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Para parar la reacción de marcaje, se agregó medio RPMI y se incubó en hielo durante 5 minutos. El pellet se lavó en tres ocasiones con medio fresco y se cultivaron 10^5 células/pozo en placas de 96-pozos en medio RPMI solo, en presencia de Concanavalina A (1 μg /pozo) o en presencia de extracto total de amiba (50 ng/pozo), a 37 °C con 5% CO_2 y 95% de humedad por 72 h. Finalmente, las células se cosecharon y fijaron con formaldehído al 3.7%. Las muestras fueron analizadas en un FACSCanto II flow cytometer (BD). Un mínimo de 10,000 eventos fueron leídos y analizados con el software DIVA.

Pruebas bioquímicas de función hepática

Al momento del sacrificio (día 49), se obtuvieron muestras de suero que se enviaron al servicio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para obtener la

determinación de alaninoaminotransferasa (por sus siglas en inglés ALT), aspartato aminotransferasa (por sus siglas en inglés AST), colesterol y albúmina. Estas determinaciones se realizaron en sueros de hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 por vía oral con diversos grados de protección (total y parcial) y en animales infectados.

Análisis estadístico

La comparación entre los grupos inmunizados y sus respectivos controles se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Para determinar las diferencias entre los grupos en los ensayos de proliferación celular y ELISAS, se realizó la prueba Kruskal-Wallis con el programa SPSS versión 19.0. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Producción de baculovirus recombinantes de expresión AcNPV-LC3, AcNPV-CREHP y AcNPV-SREHP

Los baculovirus recombinantes de expresión fueron generados co-transfectando los plásmidos de transferencia pBlueCMV-LC3, pBlueCMV-CREHP y pBlueCMV-SREHP con DNA de AcNPV en células de insecto sf9. La recombinación homóloga se llevó a cabo entre las secuencias ORF 1629 y *lacZ* contenidas en el plásmido de transferencia pBlueCMV (Fig. 11A) y el DNA linearizado de AcNPV (Bac-N-Blue DNA). Las proteínas amibianas clonadas en el vector pBlueCMV están bajo el control del promotor de CMV con la finalidad de conducir una alta expresión de dichas proteínas en células de mamífero y de esta manera, permitir su reconocimiento por el sistema inmunológico. Los plásmidos pBlueCMV-LC3, pBlueCMV-CREHP y pBlueCMV-SREHP liberaron los fragmentos clonados en los sitios HindIII/XbaI con el peso molecular esperado, 1062 pb para LC3, y 699 pb para CREHP y SREHP (Fig. 11B).

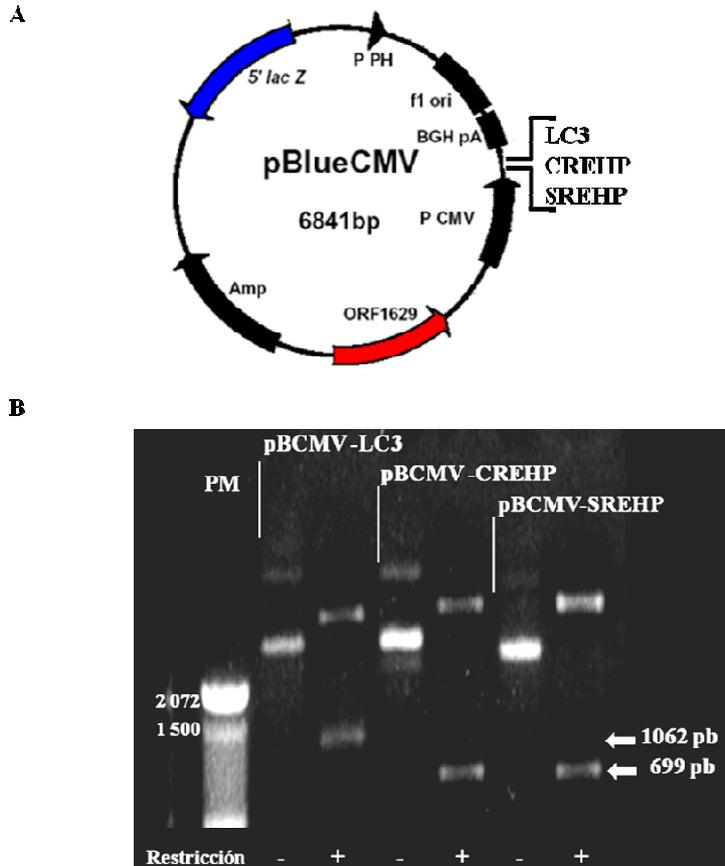


Figura 11. Clonación de las regiones codificantes de LC3, CREHP y SREHP en el plásmido de transferencia pBlueCMV. A. Plásmido de transferencia pBlueCMV. B. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pBlueCMV-LC3, pBlueCMV-CREHP y pBlueCMV-SREHP y la restricción en HindIII/XbaI con la liberación de los fragmentos LC3 de 1062, CREHP y SREHP de 699 pb.

Identificación de baculovirus recombinantes de expresión de LC3 y transducción de células de mamífero

Baculovirus recombinantes AcNPV-LC3 se identificaron mediante un ensayo de placa lítica a partir de la cual se aislaron seis clonas virales distintas. Con cada clona se infectaron células sf9 durante 5 días; posteriormente, se agregó al sobrenadante X-gal, que por acción de la β galactosidasa reconstituida en las clonas recombinantes da lugar a una coloración azul del medio (Figura 12A y B). De esta manera, encontramos que todas las clonas ensayadas excepto la número 4 reconstituyeron el gen de *lacZ* durante el proceso de

recombinación homóloga (Figura 12B). Adicionalmente, para determinar si los baculovirus que expresan la β -galactosidasa contienen la secuencia de LC3 en su genoma, se purificó DNA a partir de cada clona recuperada del ensayo de placa lítica y se amplificó por PCR la secuencia de LC3 (Figura 12C) todas las clonas excepto la número 4 amplificó la secuencia LC3.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la capacidad de AcNPV-LC3 de transducir células de mamífero y conducir la expresión de LC3, partículas virales recombinantes se utilizaron para conducir la expresión de la proteína amibiana LC3 en células de mamífero HepG2. Mediante Western blot, con un antisuero policlonal anti-lectina de *E. histolytica*, se demostró el reconocimiento de una banda de masa molecular de 50 kDa, que corresponde a la masa esperada para LC3 (Fig. 12D, línea 3).

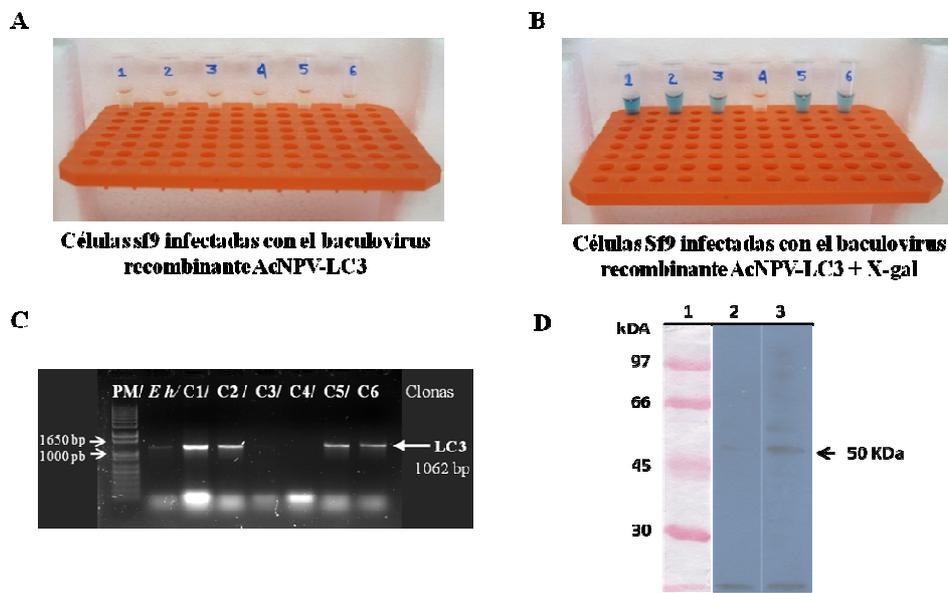


Figura 12. Determinación de clonas recombinantes y expresión de la proteína amibiana LC3 en células de mamífero transducidas con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3. A. Células Sf9 en cultivo infectadas con seis clonas de baculovirus que fueron recuperadas de un ensayo de placa lítica. B. Clonas mostradas en el panel anterior a las que se agregó X-gal cuya expresión de β -galactosidasa es traducida con la coloración azul del medio. C. Amplificación de la secuencia de LC3 a partir de DNA de las seis clonas de baculovirus aisladas. D. Western blot de un extracto de células HepG2 transducidas usando un antisuero de anti-Gal-lectin policlonal de conejo.

Producción de baculovirus recombinantes de despliegue AcNPVdisplay-LC3, AcNPVdisplay-CREHP y AcNPVdisplay-SREHP

Los baculovirus recombinantes de despliegue se generaron clonando las secuencias de las proteínas amibianas mencionadas previamente en marco de lectura abierto con la secuencia de la glicoproteína GP64 en el plásmido pGP64display (Figura 13A). Posteriormente, el cassette de las secuencias GP64-CREHP, GP64-LC3 y GP64-SREHP obtenido por la restricción de los plásmidos pGP64display-CREHP, pGP64display-LC3 y pGP64displaySREHP en los sitios EcoR1/Sal1, se separó por electroforesis y se purificó a partir del gel de agarosa (Figura 13B). Finalmente, este cassette se subclonó en el plásmido de transferencia pBlueBac4 (Figura 13C). La obtención de los baculovirus se realizó de la manera descrita anteriormente para los baculovirus de expresión. En este sistema de despliegue, las proteínas amibianas se expresaron fusionadas con la glicoproteína GP64 de los baculovirus, de esta manera, están expuestas en la superficie de los viriones para ser presentadas al sistema inmune del animal inmunizado.

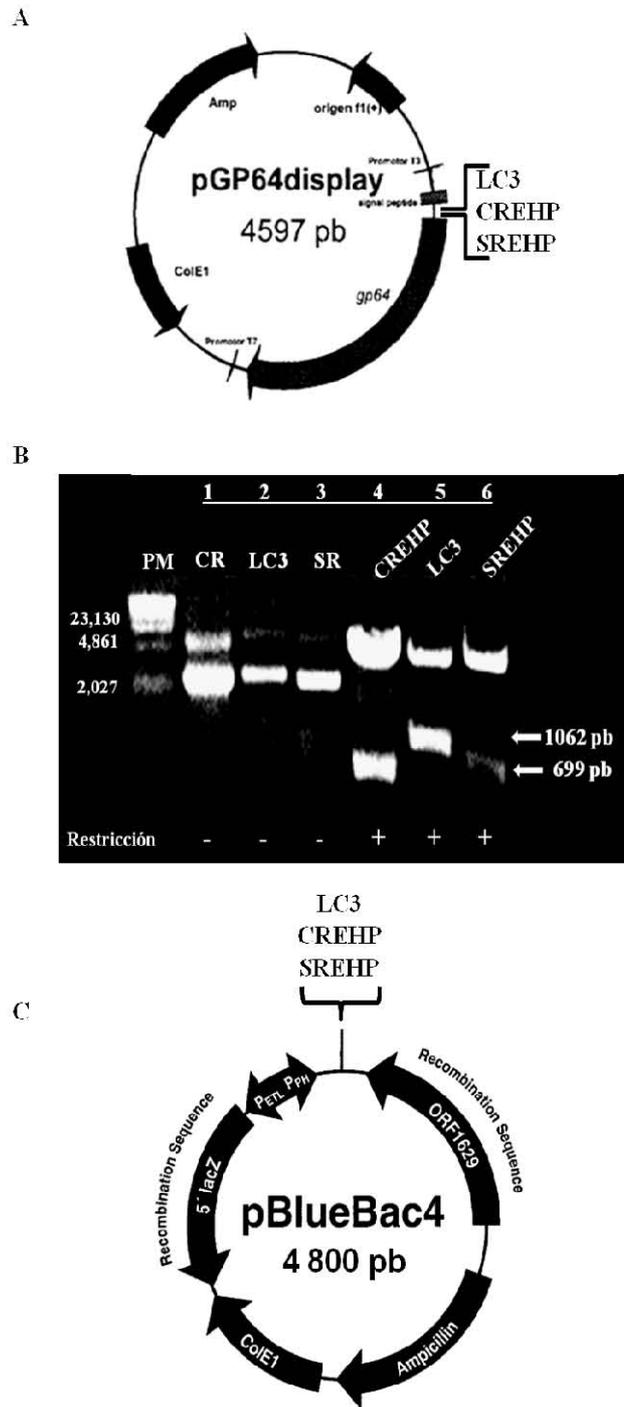


Figura 13. Clonación de las regiones codificantes de LC3, CREHP y SREHP en el plásmido pGP64display y subclonación en el plásmido de transferencia pBlueBac4. A. Plásmido pGP64display con sitio de clonación múltiple en marco de lectura abierto con la proteína GP64. B. Gel de agarosa en el que se muestra electroforesis de los plásmidos, pGP64display-CREHP, pGP64display-LC3 y pGP64display-SREHP (cariles 1, 2 y 3, respectivamente) y la restricción en los sitios de clonación EcoRI/SalI con liberación de los fragmentos clonados CREHP, LC3 y SREHP, con el peso molecular esperado (cariles 4,5 y 6, respectivamente). C. Plásmido de transferencia pBlueBac4 que contiene los sitios de recombinación homóloga ORF 1629 y *lacZ*.

Immunización oral y nasal con AcNPV-LC3 confirió protección contra el reto de AHA

Con la finalidad de evaluar el grado de protección en relación al desarrollo de AHA, documentamos una descripción macroscópica comparativa de los hígados de todos los grupos experimentales: abscesos diseminados, parciales o ausencia de lesiones. Así, 57.9% (11 de 19) de hámsteres del grupo O AcNPV-LC3 (oral) y 21% (4 de 19) del grupo N AcNPV-LC3 (nasal) no desarrollaron lesiones macroscópicas de AHA, sugiriendo protección total en estos animales (Tabla 5). Por otra parte, se encontraron numerosos abscesos diseminados en el parénquima hepático en el 100% de los animales del grupo sham (19 de 19), en el 89.4% (17 de 19) del grupo O AcNPV-WT (baculovirus silvestre oral) y en el 100% (14 de 14) del grupo AcNPV-WT (silvestre nasal) (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de infección en hámsteres controles e inmunizados en mucosas con baculovirus, seguido del reto por inoculación intra-portal con trofozoítos virulentos de *E. histolytica*.

Grupos	Infectados/ Total (%) infección	^a Protección total (%)	^b valor de <i>p</i> (Fisher's)	^c Protección Parcial %	^d Protección final %	^e valor de <i>p</i> (Fisher's)
Sham	19/19 (100%)	0	0	0	0	0
N AcNPV-WT	14/14 (100%)	0	0.119 (vs N AcNPV-LC3)	--	0	0.119 (vs N AcNPV-LC3)
N AcNPV-LC3	15/19 (78.9%)	21	0.105 (vs Sham)	--	21	0.105 (vs sham)
O AcNPV-WT	17/19 (89.4%)	10.5	0.005 (vs O AcNPV-LC3)	--	10.5	0.0001 (vs O AcNPV-LC3)
O AcNPV-LC3	8/19 (42.1%)	57.9	0.0001 (vs Sham)	21	78.9	0.0001 (vs sham)

^aEn el porcentaje de ajuste se restó el porcentaje de protección del grupo inmunizado con AcNPV-WT a su respectivo grupo experimental (AcNPV-LC3). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat 3.

^b Hámsteres sin daño hepático evidente por observación macro y microscópica.

^c Valor de *p* considerando la protección total.

^d Animales con lesiones hepáticas >20% de la totalidad del órgano.

^e Suma de la protección total y parcial.

^f Valor de *p* considerando la protección final.

Similares características se observaron en los 4 y 15 hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 y no protegidos por vía oral y nasal, respectivamente. Por otra parte, cuatro animales del grupo O AcNPV-LC3 mostraron diferencias en el desarrollo de AHA

comparándolos con el grupo sham y control WT; en particular, los abscesos se localizaron en su mayoría en un lóbulo y fueron de menores dimensiones. El porcentaje y el número de animales protegidos, parcialmente protegidos y no-protegidos, se muestra en la figura 14A.

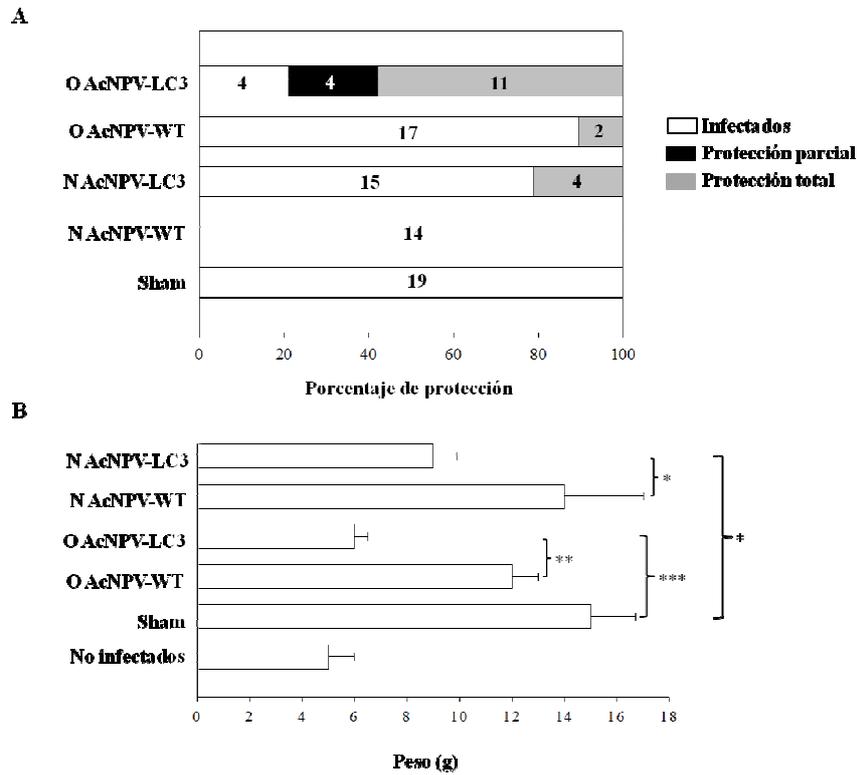


Figura 14. Evaluación de la protección observada en hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 y retados.
A. Porcentaje de animales infectados (barras abiertas), con protección parcial (AHA en 20% del parénquima hepático; barras negras) y protección total (sin evidencia de AHA; barras grises) para cada grupo experimental. El número de animales que corresponde a cada grado de protección esta escrito en cada barra.
B. Evaluación del daño en relación al peso. Tuker-Kramer ($p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$).

Las diferencias en el desarrollo de AHA se observaron también al comparar el peso del hígado de todos los grupos, debido a que el AHA está directamente relacionado al desarrollo de hepatomegalia. En promedio, un peso de 6 g fue observado para un hígado en el grupo O AcNPV-LC3 de animales inmunizados, mientras que en el grupo N AcNPV-LC3 el promedio fue de 9 g. Estos valores son significativamente menores cuando los comparamos con el grupo sham en el que el peso promedio fue de 15 g ($p < 0.001$ contra la

vía oral y una $p < 0.005$ contra la vía nasal; Fig. 14B). Por otra parte, el peso promedio del grupo O AcNPV-LC3 también fue diferente al grupo O AcNPV-WT ($p < 0.005$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados por vía nasal con AcNPV-LC3 y AcNPV-WT. En conjunto, estos resultados muestran que los hámsteres inmunizados principalmente por la vía oral, mostraron una protección ante el desarrollo de AHA.

Las observaciones macroscópicas se confirmaron por análisis microscópico de todos los hígados; de esta manera, corroboramos la ausencia de daño en el parénquima hepático, de infiltrado inflamatorio y de trofozoítos en cortes de diferentes fragmentos de los hígados que presentaron protección total (Figura 15A y B). Por el contrario, múltiples lesiones macroscópicas se observaron en todo el parénquima hepático de animales inmunizados no protegidos e infectados del grupo sham (Figura 15E y G), en los cuales a la observación microscópica se encontraron múltiples zonas de necrosis extensiva, licuefacción de tejido y trofozoítos dispersos (asterisco), rodeadas de infiltrado inflamatorio (flecha) (Figura 15F y H). Por su parte, los hámsteres protegidos de manera parcial mostraron una considerable reducción en el número y esparcimiento de los abscesos ($\leq 20\%$ del parénquima hepático), como también en el número de trofozoítos con respecto a los grupos sham (Fig. 15C y D contra recuadros E a H).

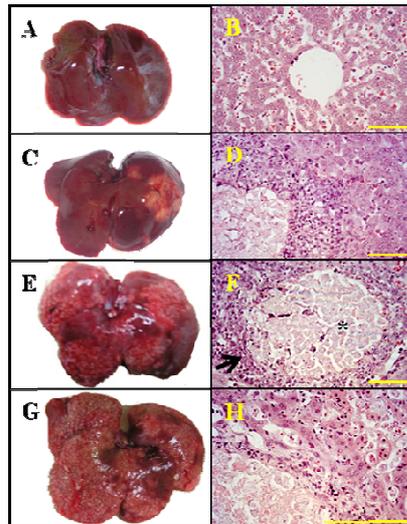


Figura 15. Desarrollo de AHA y análisis microscópico del daño hepático en hámsteres inmunizados en mucosas con AcNPV-LC3 después del reto intra-portal con *E. histolytica*. La flecha señala el infiltrado inflamatorio que rodea el absceso y el asterisco el centro necrótico. Barra amarilla: 100 μ m.

Si consideramos el porcentaje de protección total (57.9%) y el parcial (21%) observado en hámsteres inmunizados por vía oral con AcNPV-LC3 y retados, podemos sumar un 78.9% de protección final (total más parcial) en este grupo. Sin embargo, el porcentaje cae a 68.4% si consideramos que 10.5% de los animales inmunizados con el baculovirus silvestre se protegieron (Tabla 5).

Vacunación oral y nasal con AcNPV-LC3 induce anticuerpos anti-amiba en sangre

Anticuerpos IgG anti-trofozoítos fueron observados en el suero post-inmune de los grupos O AcNPV-LC3 y N AcNPV-LC3 mediante ELISA. Por el contrario, sus respectivos controles inmunizados con AcNPV-WT no desarrollaron anticuerpos IgG anti-amiba ($p < 0.001$ y $p < 0.005$ para la vía oral y nasal, respectivamente). Debido a que los sueros pre-inmunes y los inmunizados con el baculovirus silvestre no mostraron anticuerpos específicos contra el extracto amibiano, nosotros asumimos que los niveles de anticuerpos

detectados en los hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 por ambas rutas son anticuerpos específicos contra LC3, y por lo tanto, contra la subunidad pesada de la lectina de *E. histolytica*. No observamos respuesta humoral sistémica en los grupos sham y control no infectados ($p < 0.001$) cuando los comparamos con los grupos inmunizados con AcNPV-LC3. Interesantemente, no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos entre los animales de los grupos inmunizados (vía oral y nasal con AcNPV-LC3 $p > 0,05$) ni entre los animales del mismo grupo con diferentes grados de protección. La producción de anticuerpos IgG sin diferencias significativas en hámsteres inmunizados por ambas rutas sugiere que los anticuerpos IgG anti-amiba pueden no estar relacionados con la protección contra AHA, en comparación con las claras diferencia que se observan entre los niveles de protección en animales inmunizados con AcNPV-LC3 administrado por vía oral y nasal (Tabla 5., Fig. 16).

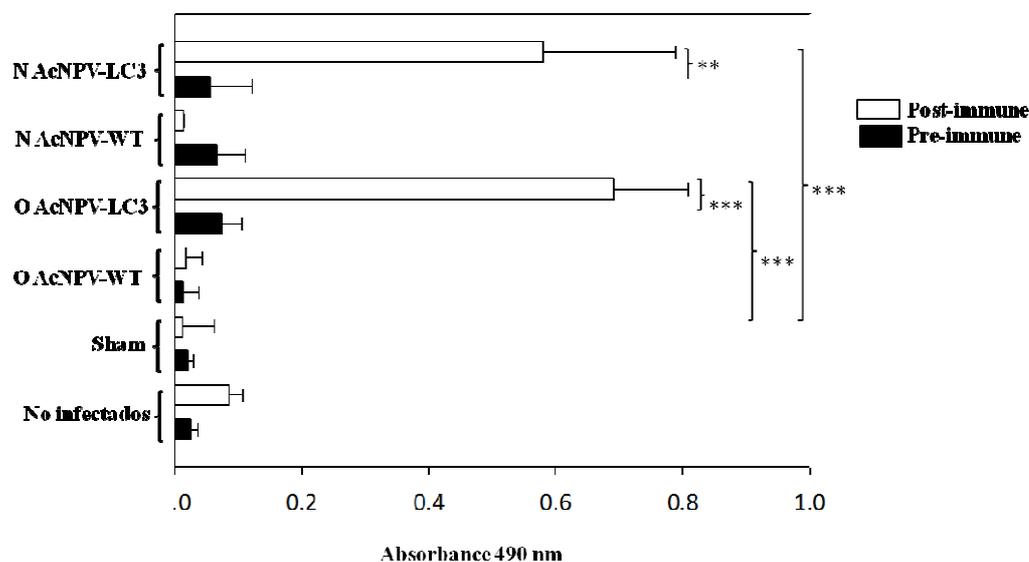


Figura 16. Respuesta inmune humoral anti-*E. histolytica* en hámsteres inmunizados en mucosas con AcNPV-LC3 y retados para desarrollo de AIFA. Anticuerpos IgG en suero contra extracto total de trofozoitos de *E. histolytica* fue medido por ELISA al día 0 pre-immune (barras negras) y previo al reto intra-portal al día 35 post-immune (barras blancas). Las barras representan la densidad óptica media ($n = 19$). Anticuerpos IgG específicos se detectaron solo en los sueros de animales inmunizados con AcNPV-LC3, independientemente de la ruta de inmunización (** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

La vacunación oral y nasal con AcNPV-LC3 induce respuesta inmune mediada por células

La activación de linfocitos asociada a la inmunización con AcNPV fue cuantificada en todos los animales por ensayos de proliferación celular de células de bazo estimuladas con extracto total de trofozoitos de *E. histolytica* y teñidas con CFSE. Como se muestra en la figura 18, todos los animales protegidos por inmunización con AcNPV-LC3 mostraron alto porcentaje de células proliferantes con la exposición antigénica de extracto total de amiba, independientemente de la ruta de inmunización. El porcentaje promedio de proliferación en estos grupos fue de 15 y 22% del total de las células de bazo analizadas para la vía oral y nasal, respectivamente. Por el contrario, solo se observó fondo de proliferación en todos los animales no protegidos, incluyendo los sham, los inmunizados

con AcNPV-LC3 que desarrollaron AHA y los inmunizados con AcNPV-WT. Interesantemente, los esplenocitos de los dos hámsteres inmunizados con AcNPV-WT y protegidos no proliferaron ante el antígeno de amiba, sugiriendo que en estos casos la protección fue debida a una respuesta celular inespecífica. Al comparar el porcentaje de proliferación entre los animales de los grupos inmunizados por vía oral, encontramos una respuesta proliferativa significativamente mayor en el grupo O AcNPV-LC3 protegido (15%) comparándola contra los no protegidos del mismo grupo (2%) y contra el grupo O AcNPV-WT (4%) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$). En la comparación de la respuesta proliferativa entre los animales inmunizados por vía nasal, se observó un porcentaje de proliferación mayor en el grupo N AcNPV-LC3 protegido (22%) con respecto a los no protegidos del mismo grupo (1.5%) y contra el grupo N AcNPV-WT (1%), diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) (Figura 17). El fondo de proliferación descrito anteriormente fue también observado en los grupos sham y control sin infectar. Estos resultados sugieren que la protección total contra el AHA en hámsteres por inmunización en mucosas con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 está directamente relacionada con la respuesta celular específica ante el parásito y es independiente de la respuesta humoral.

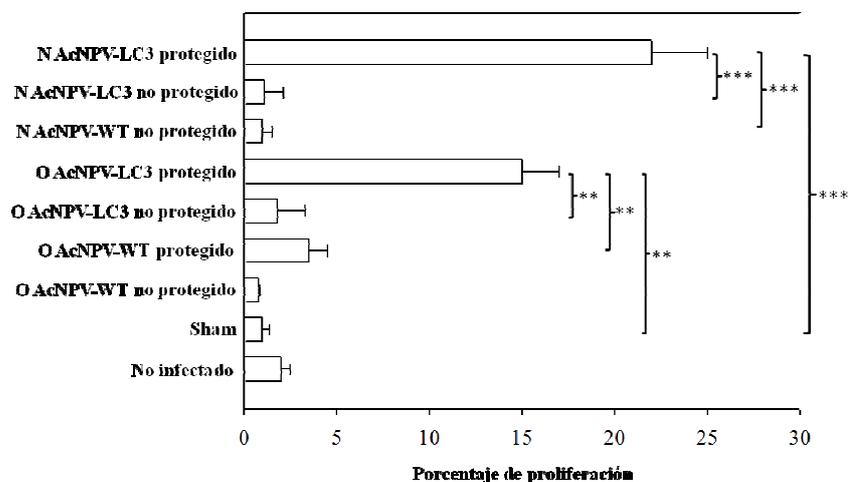


Figura 17. Respuesta proliferativa celular anti-*E. histolytica* en hámsteres inmunizados en mucosas con AcNPV-LC3 y retados para el desarrollo de AHA. La respuesta inmune celular fue evaluada en esplenocitos al tiempo de sacrificio (día 49) por tinción con CFSE de células estimuladas en cultivo con extracto total de *E. histolytica* durante 72 h. Las barras representan la media del porcentaje de proliferación de los hámsteres incluidos en cada clasificación. Proliferación específica se observó solamente en los animales protegidos, independientemente de la ruta de inmunización (** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

El grado de protección contra AHA en inmunizados con AcNPV-LC3 visto por microscopía, se corroboró con pruebas de función hepática

Suero obtenido al momento del sacrificio fue empleado para determinar transaminasas hepáticas como la ALT y AST de los hámsteres inmunizados y retados que mostraron diversos grados de protección (infectados, parcialmente protegidos y protegidos) con respecto a sueros de animales no infectados de la misma edad (Tabla 6).

Tabla 6. Determinación de transaminasas hepáticas en suero de hámsteres inmunizados por vía oral con AcNPV-LC3 y retados con *E. histolytica*.

	Sin infección	Sham	OAcNPV-LC3		
			Protección total	Protección parcial	No protegidos
Peso (g)	5.2	17.6	5.1	5.5	7
ALT (U/L) <87	66	1049	80	1372	1180
AST (U/L) <99	68	1531	1289	2050	665

Al evaluar los valores reportados para cada animal, representante de cada uno de los grupos, encontramos que el suero del hámster sham sin infectar tiene valores funcionales dentro del intervalo de normalidad, mientras que el animal del grupo sham infectado supera 2.38 veces el peso de referencia (sham no infectado), 15.8 veces el valor de ALT y 22.5 veces el de AST. De la misma forma, el hámster infectado perteneciente al grupo O AcNPV-LC3, tuvo un peso 0.3 veces superior, ALT 13.5 y AST 6.7 veces superior a la referencia. Por otra parte, el hámster con protección parcial del grupo O AcNPV-LC3, tuvo un incremento de 15.7 veces de ALT y 20.7 veces de AST en comparación con el animal del mismo grupo con protección total que tuvo un incremento de 13 veces de AST, pero valores de ALT dentro del parámetro de referencia (Tabla 6). Estos datos indican que las pruebas de función hepática están directamente relacionadas con el grado de protección y la hepatomegalia observada en los animales estudiados.

La inmunización intramuscular con AcNPV-LC3 confirió protección contra el desarrollo de AHA en hámsteres retados

Con la finalidad de comparar la eficacia de protección conferida por la inmunización en mucosas con el AcNPV-LC3 contra una inmunización parenteral, decidimos incluir un grupo inmunizado por vía intramuscular, ya que esta vía de inmunización fue ampliamente reportada en ensayos de protección con baculovirus recombinantes. La evaluación del grado de protección se realizó de acuerdo a los criterios establecidos para la vía de mucosas. De esta manera encontramos que el 30% del grupo IM AcNPV-WT (6 de 20) y 55% del grupo IM AcNPV-LC3 (11 de 20), no desarrollaron AHA, lo que sugirió protección total en estos animales (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de infección en hámsteres controles e inmunizados con AcNPV-LC3 y retos.

Grupos	Infectados/Total infección (%)	^a Protección total (%)	^b Protección Parcial%	^c Protección final %	^d valor de <i>p</i> (Fisher's)
Sham	8/10 (80%)	0	0	0	0
IM AcNPV-WT	14/20 (70%)	30	5	35	0.02 (vs IM AcNPV-LC3)
IM AcNPV-LC3	9/20 (45%)	55	20	75	0.002 (vs IM Sham)

Análisis estadístico GraphPad InStat 3.

^a Hámsteres sin daño hepático.

^b Animales con lesiones por debajo del 20% de AHA.

^c Suma de la protección total y parcial.

^d Valor de *p* considerando la protección final.

Por otra parte, se encontraron numerosos abscesos diseminados en el parénquima hepático en el 80% de los animales del grupo sham (8 de 10), en el 65% del grupo IM AcNPV-WT (13 de 20) y en el 25% del grupo IM AcNPV-LC3 (5 de 20). Por otra parte, animales del grupo IM AcNPV-WT e IM AcNPV-LC3, mostraron protección parcial en el 5 y 20 %, respectivamente. Al sumar los porcentajes de protección parcial y total tenemos una protección final de 35 y 75% para el grupo IM AcNPV-WT e IM AcNPV-LC3, respectivamente (Figura 18A). Sin embargo, es de hacer notar que en esta ocasión el grupo sham infectado desarrolló AHA solo en el 80%. De este modo, tras un ajuste con el grupo sham, podemos decir que la protección final fue de 15 y 55% para los grupos IM AcNPV-WT y AcNPV-LC3, respectivamente. Finalmente, el análisis estadístico con la prueba de Fisher indica que existen diferencias estadísticas al comparar el grupo IM AcNPV-LC3 con los grupos sham y AcNPV-WT ($p < 0.02$ y 0.002 , respectivamente) (Tabla 7).

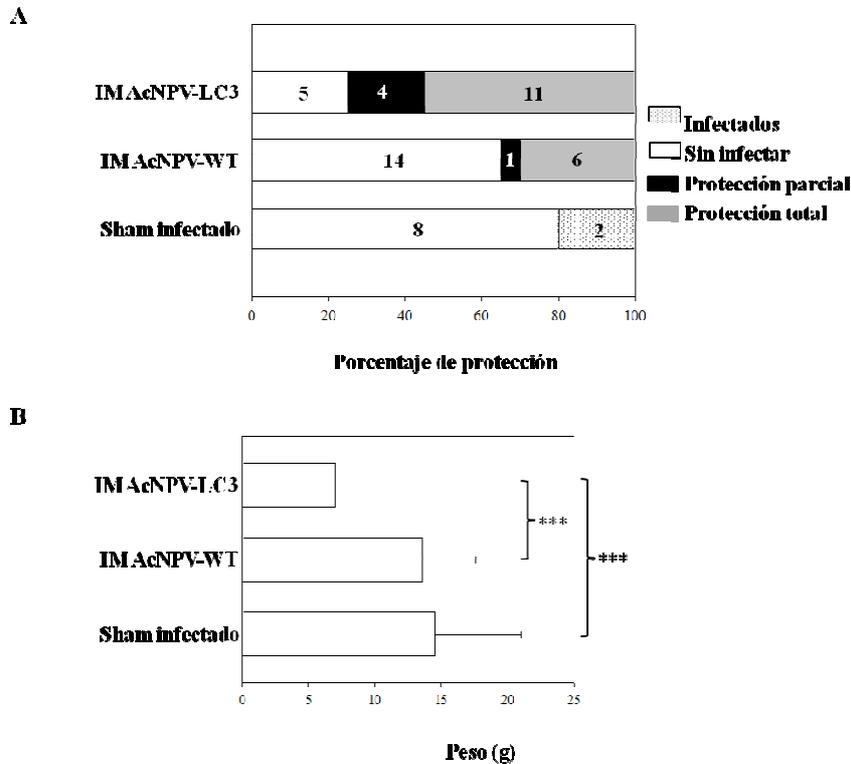


Figure 18. Protección contra AHA en hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 por vía intramuscular. A. Porcentaje de animales infectados (barras abiertas), protección parcial (AHA en 20% del parénquima hepático; barras negras) y protección total (sin evidencia de AHA; barras grises) de cada grupo experimental. El número de animales que corresponde a cada grado de protección aparece en el segmento de la barra. B. Hepatomegalia relacionada al daño hepático producido por el reto intra-portal en animales inmunizados. Se graficaron los pesos con DS para cada grupo experimental. Análisis estadístico Tukey-Kramer, $r^* p < 0.001$.

El desarrollo de hepatomegalia medido en el peso del hígado de todos los animales, nos indicó que el promedio del grupo sham fue de 14.5 g (± 6.5), mientras que el peso del grupo IM AcNPV-LC3 fue de 7 g (± 2). En comparación a este grupo, el inmunizado con el baculovirus WT tuvo un peso promedio de 13.5 g (± 4). Con estos datos encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo IM AcNPV-LC3 contra IM AcNPV-WT y el grupo sham ($p < 0.001$) (Figura 18B).

Determinación de daño hepatocelular en relación a la protección (total o parcial)

Dado que el parámetro más preciso en relación al daño hepatocelular es la determinación de ALT, decidimos evaluar el nivel de esta enzima en 5 animales de los grupos sham infectado e IM AcNPV-LC3 con protección parcial y total (Tabla 8). La determinación de ALT muestra claras diferencias entre los animales del grupo sham infectado con respecto al grupo IM AcNPV-LC3 con protección total y parcial. Es de hacer notar que todos los valores de ALT en el grupo IM AcNPV-LC3 con protección total están dentro del valor de referencia 32.2 U/L (± 10.1), mientras que el grupo con protección parcial tuvo determinaciones de 169.4 U/L (± 112.3) y el grupo sham infectado tuvo los valores más elevados de ALT, con 258.8 U/L (± 163.2) (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación de transaminasas en suero de hámsteres inmunizados por vía intra-muscular con AcNPV-LC3 e infectados con *E. histolytica*.

	Sham infectado (n=5)	IMAcNPV-LC3 Protección total (n=5)	IMAcNPV-LC3 Protección parcial (n=5)
Peso (g)	15 \pm 3.9	6 \pm 2.3	6.3 \pm 3.2
ALT (U/L) <87	258.8 (± 163.2)	32.2 (± 10.1)	169.4 (± 112.3)

Expresión de IFN γ e IL-4 en parénquima hepático de hámsteres inmunizados y retados para AHA con diversos grados de protección

Con la finalidad de caracterizar la respuesta inmunológica asociada a la protección conferida por la vacunación parenteral con AcNPV-LC3, se determinó la expresión de IFN γ como citocina de la respuesta Th1 y la molécula determinante en la respuesta inmune protectora en ensayos de vacunación ante el reto intestinal y hepático. Adicionalmente, se determinó la expresión de IL-4 como una citocina clásica de la respuesta Th2. De manera interesante, encontramos que la expresión de IFN γ e IL-4 están directamente relacionadas

con el grado de protección conferida, al comparar la expresión de ambas citocinas entre el grupo sham infectado (50 y 15 pg/mL de IFN γ e IL-4, respectivamente) y el grupo inmunizado vía intramuscular con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 con protección total, es decir, sin desarrollo de abscesos (430 y 80 pg/mL de IFN γ e IL-4, respectivamente) hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a ($p < 0.05$). Sin embargo, al comparar la expresión de estas citocinas entre los hámsteres del grupo inmunizado con AcNPV-LC3 con protección parcial (desarrollo de AHA $\leq 20\%$ del parénquima hepático) contra el grupo inmunizado con AcNPV-LC3 con protección total y el grupo sham infectado, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Figura 19).

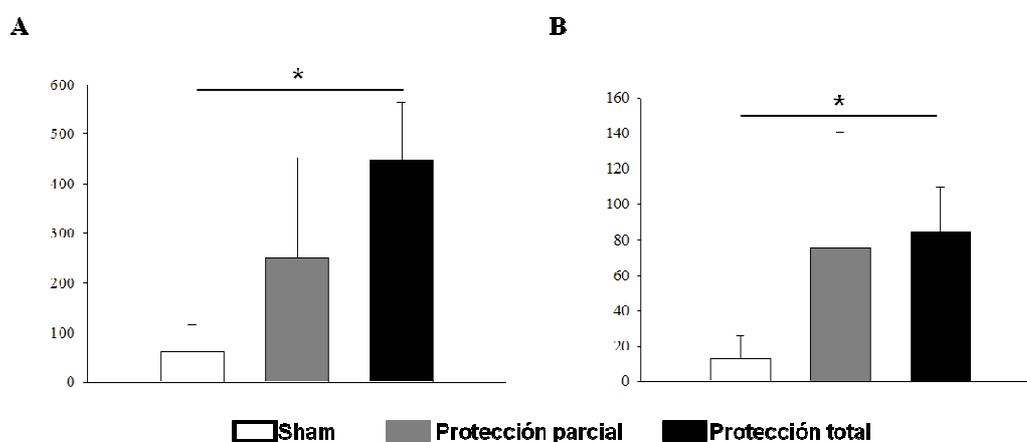


Figura 19. Expresión de IFN γ e IL-4 en hígados de hámsteres inmunizados con AcNPV-LC3 vía intramuscular y retados. Expresión de IFN γ (A) e IL-4 (B) en parénquima hepático de hamsteres del grupo sham, barra blanca; con protección parcial, barra gris y protección total barra negra. (* $p < 0.05$).

A manera de resumen y utilizando los elementos que nos permitieron evaluar las diferencias entre los diferentes grados de protección conferida por la inmunización intramuscular con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3, en la figura 20, se muestran las fotografías macro y microscópicas de los hígados de animales pertenecientes a los

grupos sham y al grupo inmunizado con AcNPV-LC3 con diferentes grados de protección. Además, se incluyeron los valores del peso, ALT e IFN γ documentados para cada órgano (Figura 20).

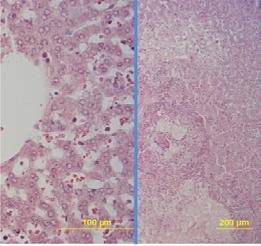
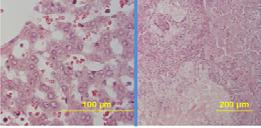
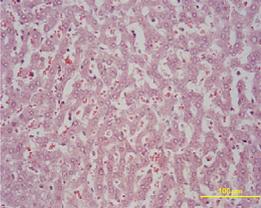
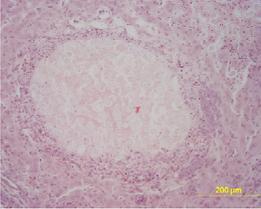
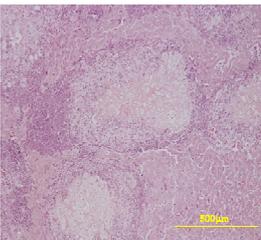
Grupo	Macroscópico	Microscópico	Peso (g)	ALT (U/L)	IFN γ (pg/mL)
Sham no-infectado			6.0	27	48
Sham infectado			20.3	500	59
Protegido			6.3	49	500
			5.1	34	470
Parcialmente protegido			6.8	69	410
			8.9	203	257
No protegido			16.5	271	80
			18	385	45

Figura 20. Análisis microscópico, bioquímico e inmunológico de los hígados de hámsteres inmunizados via intra-muscular con AcNPV-LC3 después del reto de AHA. Columna 2 y 3, características macroscópicas y microscópicas de hígados representativos con diferentes grados de protección ante el reto de AHA; columna 4, peso del órgano; columna 5, determinación de ALT en suero y columna 6, expresión de IFN γ en el parénquima hepático.

Es clara la relación directamente proporcional entre el desarrollo de AHA, la hepatomegalia desarrollada medida por el peso del órgano y elevación del nivel de ALT por

encima de los valores de referencia y la relación inversa que existe entre el desarrollo del AHA y la producción de IFN γ .

Discusión

La lectina de *E. histolytica* es una molécula indispensable en la patogénesis de este parásito y el principal candidato a vacuna. Se ha sugerido que anticuerpos IgAs anti-lectina de *E. histolytica* confieren resistencia a la reinfección de amibiasis intestinal en humanos y que este antígeno, utilizado en ensayos de protección, es efectivo ante el reto de AHA experimental. Estos hallazgos, llevaron a los expertos de la OMS a emitir la recomendación para el desarrollo de una vacuna contra *E. histolytica* dado que este parásito es endémico en países en vías de desarrollo y es una importante causa de morbi-mortalidad. Sin embargo, el desarrollo de vacunas contra microorganismos que infectan la mucosa intestinal tiene una limitante común: la falta de un adyuvante seguro y eficaz para la administración de antígenos en humano. En este trabajo proponemos el empleo del baculovirus recombinante AcNPV-LC3 como un vector de vacunación, que a diferencia de otros vectores empleados en ensayos de protección contra *E. histolytica*, es un vector inocuo, incapaz de replicarse en células de mamífero y por ende, de causar efectos citopáticos (Shoji y cols, 1997), sin inmunidad pre-existente conocida en humanos (Georgopoulos LJ, 2009), con riesgo ambiental nulo y aprobado por la FDA como bioinsecticida para el control de plagas, tanto en cultivos agrícolas como en ecosistemas forestales granos de consumo humano (Koppers-Lalic D y Hoeben R. 2011) y para la producción de proteínas recombinantes de uso clínico. Adicionalmente, este virus tiene propiedades de adyuvante, lo que le permite inducir una respuesta humoral y celular antígeno-específica.

Por las características descritas previamente, se ha propuesto al baculovirus como un atractivo vector para vacunación, terapia génica y sistema de expresión de proteínas para uso clínico (Madhan y cols, 2010).

Para demostrar la capacidad adyuvante del baculovirus recombinante, se realizaron ensayos preliminares inmunizando por vía oral y nasal a ratones Balb/c con diferentes dosis de baculovirus que expresan la proteína de fluorescencia verde (GFP) fusionada en el extremo amino-terminal de la glicoproteína de superficie Gp64. En estos ensayos se estandarizó la dosis para inducir una respuesta inmune antígeno específica en 1×10^8 pv y se documentó la cinética de producción de anticuerpos en los animales inmunizados por ambas vías, encontrando que el mayor título de anticuerpos IgG séricos e IgAs anti-baculovirus en sobrenadante de heces se observó a los 14 y 21 días para la vía oral y nasal, respectivamente. Por otra parte, encontramos anticuerpos IgG séricos e IgAs anti-GFP en los animales inmunizados por vía oral, demostrando que la inmunización por vía de mucosas con los baculovirus recombinantes es capaz de generar una respuesta sistémica (Meneses-Ruiz DM, Laclette JP, Luz-Madrigal A, Vaca L y Carrero JC, datos no mostrados).

Al momento que se inició este estudio, la eficacia de baculovirus recombinantes administrado por vía oral para inducir una respuesta antígeno-específica no había sido reportada en la literatura. Sin embargo, múltiples trabajos habían propuesto al baculovirus como un vector y adyuvante eficiente dada su capacidad de activar CPA y producir una respuesta antígeno-específica (Abe T y Matsuura Y, 2010). Recientemente, se documentó la eficiencia de baculovirus administrados por vía oral en ratón de inducir una respuesta inmune (Prabakaran y cols, 2010; Madhan y cols, 2010; Syed y Kwang, 2011) y se ha propuesto un modelo del mecanismo de inducción de dicha respuesta (sistémica y en mucosas), soportando el uso de baculovirus recombinantes como un vector de vacunación con capacidad de adyuvante seguro y eficiente (Madhan y cols, 2010).

Una vez demostrada la propiedad de adyuvante de los baculovirus por mucosas, se construyó el baculovirus recombinante AcNPV-LC3, el cual contiene un casete con el promotor temprano del CMV y la región codificante del fragmento LC3 de la lectina de *E. histolytica*. Para demostrar que el baculovirus AcNPV-LC3 es capaz de transducir células de mamífero y expresar eficientemente el péptido LC3, células HEPG2 (la línea celular con más alta eficiencia de transducción; Hofmann y cols, 1995, Luz-Madrigal y cols, 2007) fueron transducidas con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 y mediante western blot se demostró la expresión de la LC3 amibiana (véase en resultados).

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunización y reto en el modelo experimental de AHA. En estos ensayos, encontramos protección total, es decir ausencia de amibas y daño, en el 57.9%, 21% y 55% para los animales inmunizados con AcNPV-LC3 por vía oral, nasal e intramuscular, respectivamente y protección parcial, con $\leq 20\%$ de daño hepático, en el 21% y 20% de los animales inmunizados por vía oral e intramuscular, respectivamente (Tablas 5 y 7, figuras 14, 15 y 18). El hecho de que los animales inmunizados con AcNPV-LC3 desarrollaron una respuesta humoral y celular anti-amiba, sugiere que el virus fue capaz de transducir células del epitelio intestinal y nasal y/o células inmunes de los animales *in vivo*. Estas células expresaron el péptido LC3 bajo el control del promotor de CMV que posteriormente fue procesado y presentado al sistema inmune de manera eficiente, generando así inmunidad protectora. Al comparar los porcentajes de protección final conferidos por el AcNPV-LC3 administrado por diferentes vías, encontramos que la vía de inmunización más efectiva fue la vía oral (78.9%) seguida por la vía intramuscular (75%), y la vía menos eficiente fue la nasal (21%). Sin embargo, es indispensable mencionar que la protección parcial observada en este trabajo no implica que la inmunización permita al animal retado resolver la infección parasitaria, para resolver esta

interrogante, será necesario evaluar este grupo a mayor tiempo del reto para determinar si la respuesta inmune inducida por el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 es capaz de eliminar o limitar el desarrollo del AHA inducido experimentalmente. En este sentido, el aumento de la expresión de INF γ en el parénquima hepático de estos animales, sugiere que el sistema inmune puede ser capaz de limitar el crecimiento del absceso y eventualmente resolverlo debido a que esta respuesta se ha relacionado ampliamente a protección en este modelo experimental (Martínez y cols, 2009).

En este sentido, Soong CJ y cols reportaron que la inmunización intraperitoneal con la proteína LC3 recombinante con Titermax como adyuvante, fue capaz de inducir producción de altos títulos de IgG séricos y protección ante el reto de AHA en gerbos con una eficacia de 71% (Soong y cols, 1995). Este trabajo es el único antecedente del empleo de LC3 en ensayos de protección contra AHA, sin embargo, no es del todo comparable con el proyecto presentado en esta tesis debido a que los trofozoítos de *E. histolytica* aparentemente son menos virulentos en gerbos que en hámsteres (Tsutsumi y Shibayama, 2006), a que la carga parasitaria que emplearon para el reto de AHA fue de 5×10^5 trofozoítos (Soong y cols, 1995), lo que representa el 50% de la dosis empleada en este trabajo y a que la vía de inmunización es distinta, lo que implica una diferencia en el reconocimiento antigénico y presentación al sistema inmune.

La determinación de la protección conferida por la inmunización con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 se realizó mediante el análisis macro y microscópico de múltiples segmentos del hígado. Sin embargo, el estudio histológico no precisa el efecto inducido por el reto a nivel celular en la totalidad del órgano; por este motivo y con la finalidad de tener parámetros específicos de daño hepatocelular, se realizó la determinación

de pruebas de función hepática en el suero de hámsteres inmunizados y retados. De los analitos determinados, el que aporta mayor información es la determinación de la ALT, debido a que valores mayores de 87 U/L indican lisis hepatocelular y por lo tanto, indica de manera más precisa daño hepático por mínimo que este sea. A diferencia de este analito, la elevación de la AST se puede producir también por daño en otros tejidos como el muscular, pancreático, renal, cerebral y pulmonar, lo que hace que la elevación de esta enzima por si misma sea inespecífica (Harrison, 1998). Por esta razón, decidimos tomar como parámetro bioquímico de daño hepático la elevación de la ALT y emplearla también como una herramienta para clasificar el grado de protección conferida por la inmunización con AcNPV-LC3. De esta manera, encontramos una elevación en el nivel sérico de ALT en los animales del grupo sham (258.8 ± 163.2) y del grupo O AcNPV-LC3 parcialmente protegidos (169.4 ± 112.3); por el contrario, los valores del grupo O AcNPV-LC3 con protección total están dentro de parámetros fisiológicos ≤ 87 U/L (32.2 ± 10.1) (Tabla 6 y 8). Estos datos indican una clara correlación entre el grado de protección (determinado por hallazgos histológicos) y el nivel sérico de ALT (parámetro bioquímico que indica de manera específica daño hepatocelular).

La capacidad de inducir una respuesta inmune humoral y celular con baculovirus recombinantes de expresión fue documentada por primera vez por Yoshida y colaboradores en el 2009. Este grupo empleó un sistema de baculovirus con expresión dual (despliegue y expresión) denominado AcNPV-CMV-PbCSP. En este ensayo, encontraron que los ratones inmunizados por vía intramuscular con este baculovirus recombinante, desarrollaron una respuesta protectora tipo Th1/Th2 determinada por altos títulos de anticuerpos séricos IgG anti-PbCSP y la expresión de IFN γ por esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados

como marcador de proliferación antígeno-específica (Yoshida y cols, 2009). Con la finalidad de evaluar que componentes de la respuesta inmune adaptativa están relacionados con la protección conferida por el AcNPV-LC3, se determinó la presencia de anticuerpos IgG anti-amiba en suero y la respuesta linfoproliferativa de esplenocitos extraídos de los animales inmunizados y estimulados con extracto total de amiba.

Anticuerpos séricos IgG anti-amiba se observaron solo en los animales inmunizados con AcNPV-LC3, por lo que su presencia correlacionó con la protección; sin embargo, el título de los mismos no mostró una correlación con el grado de protección obtenido (Figura 16). Este resultado es opuesto a aquel reportado por Lotter y cols en el 2000, quienes encontraron correlación entre el grado de protección y el título de anticuerpos producido en gerbos inmunizados con péptidos derivados de la CDR de la lectina de *E. histolytica*. Además demostraron que la inmunización pasiva con estos anticuerpos confirió protección a ratones SCID ante AHA (Lotter y cols, 2000). Sin embargo, para el 2008, el mismo grupo reportó que la protección ante AHA conferida por la inmunización oral con *Yersinia enterocolitica* recombinante atenuada, expresando diferentes fragmentos de la lectina de *E. histolytica*, fue mediada por mecanismos celulares e independiente del título de anticuerpos (Lotter y cols, 2008), coincidiendo con los resultados de nuestro trabajo (Figura 16 y 17). En general, la mayoría de los trabajos de inmunización contra AHA concuerda en que la respuesta inmune humoral no es la principal mediadora de protección (Mortimer y Chadee, 2010), aunque esto no significa que no participe en dicho proceso. A pesar de que los anticuerpos IgG aparentemente no son relevantes en la protección contra el AHA, los anticuerpos IgAs se han relacionado con protección en la infección intestinal (Carrero y cols 2007 y 2010, Mortimer y Chadee, 2010). Aunque en este estudio no se determinó la producción de anticuerpos IgAs debido a que el modelo de infección fue sistémico (AHA),

por estudios previos sabemos que la inmunización oral con baculovirus recombinantes induce la producción de anticuerpos IgAs antígeno-específicos (datos no mostrados y en proceso de publicación), los cuales podrían proteger contra la infección intestinal (actualmente en estudio).

Al contrario de lo observado con el título de anticuerpos séricos, encontramos una clara correlación entre el grado de protección conferida por la inmunización con AcNPV-LC3 y la respuesta linfoproliferativa. Esta respuesta fue más eficiente (en relación al porcentaje) en los animales que mostraron protección total (15 ± 2 y 22 ± 4 % para la vía oral y nasal, respectivamente) con respecto a los protegidos parcialmente (13 ± 1), y estos dos grupos a su vez mostraron mayor porcentaje de proliferación con respecto a los animales no protegidos (2 y 1.5%, respectivamente) (Figura 17). La respuesta linfoproliferativa en los esplenocitos de hámsteres inmunizados y protegidos sugiere que clonas linfocitarias antígeno-específicas respondieron proliferando al estímulo con extracto total de amiba. Por otra parte, no se observó respuesta linfoproliferativa ante antígeno amibiano en los hámsteres inmunizados con AcNPV-WT protegidos ni en los no protegidos, lo que sugiere que la escasa protección ante el AHA observada en este grupo no fue antígeno-específica, sino debido a la estimulación de clonas inespecíficas por el virus. Este hallazgo de protección inespecífica, fue documentado previamente en ensayos de protección contra el parásito *Plasmodium berghei* y el virus de Influenza (Yoshida S y cols, 2009 y Abe y cols, 2003). En este sentido, los autores han sugerido que esta respuesta protectora inespecífica puede deberse a la actividad adyuvante del AcNPV-WT, que es capaz de inducir maduración de células dendríticas, producción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas e IFNs tipo I (Hervas-Stubbs y cols, 2007).

La ausencia de proliferación de esplenocitos obtenidos a partir de hámsteres inmunizados y no protegidos ante el estímulo con extracto total del parásito y el mitógeno policlonal Con A (datos no mostrados), sugiere un fenómeno de inmunosupresión que podría estar condicionado por la activación de células Treg en animales con AHA crónico. En este sentido, se ha sugerido que la respuesta inmune en animales con AHA es regulada por el parásito hacia una respuesta Th2/Treg, lo que impide al sistema inmune eliminar a la amiba una vez establecida la infección (Mortimer y Chadee, 2010). Por lo tanto, es probable que la protección contra el AHA dependa de la rápida generación de una respuesta celular, que a su vez inhiba el desarrollo de células Treg.

Numerosos reportes apoyan la noción de que la inmunización por vía oral con diferentes antígenos confiere protección ante el reto de AHA (Mann y cols, 1997, Lotter y cols 2000, 2004 y 2008). Dicha protección está mediada por la respuesta inmune celular, en la que destacan, clonas linfocitarias antígeno-específicas y células de la respuesta inmune innata, como las células iNKT. De acuerdo a lo reportado por Lotter H y cols, las células iNKT tienen un papel fundamental en la inmunidad del hígado ante el reto de AHA, esto es porque su activación está acompañada de la expresión de IFN γ , molécula que tiene un papel preponderante en el control temprano de la invasión por *E. histolytica* tanto a nivel intestinal como a nivel hepático (Lotter y cols, 2008, 2009 y Guo y cols, 2009, 2011). En este sentido y con la finalidad de determinar si el IFN γ tiene alguna relación con el grado de protección conferido por la inmunización vía intramuscular con el AcNPV-LC3, se cuantificó su expresión en muestras representativas del hígado de hámsteres inmunizados y retados mediante ELISA (Figura 19). Los datos mostraron una correlación directamente proporcional entre la expresión de IFN γ y el grado de protección conferido por la

inmunización con el baculovirus recombinante, lo que corrobora con los hallazgos histológicos descritos previamente. El incremento en la expresión de INF γ en el hígado de los hámsteres que mostraron protección total (ausencia de abscesos), está relacionado con la capacidad del sistema inmune del animal de prevenir la invasión inicial del trofozoíto amibiano al parénquima hepático. El mecanismo propuesto acerca del papel protector del INF γ en amibiasis intestinal y hepática es que ésta citocina activa macrófagos y neutrófilos promoviendo así su actividad amebicida (Ivory y cols 2006; Lotter H y cols, 2000, 2008, 2009; Guo y cols, 2009; Martinez y cols, 2009).

Los ensayos de inmunización en este trabajo se realizaron empleando únicamente el baculovirus recombinante de expresión AcNPV-LC3, debido a que la lectina de *E. histolytica* y los fragmentos derivados de su subunidad pesada, como el LC3, son el principal candidato a vacunación. En este sentido, diversos trabajos han demostrado que esta molécula participa en procesos fundamentales del trofozoíto amibiano involucrados en la colonización, citólisis y sobrevivencia mediante los mecanismos de adherencia (Ravdin y cols, 1985), citotoxicidad mediada por contacto (Teixeira y Mann BJ, 2002), fagocitosis (Sateriale y Huston, 2011) y enquistamiento (Aguilar-Díaz y cols, 2011). Sin embargo, consideramos que el empleo de una mezcla de los baculovirus recombinantes AcNPV-LC3 con otros, como los que se desarrollaron en esta tesis (AcNPV-SR y AcNPV-CR) y que aún no se utilizan en ensayos de protección, podrían potenciar la respuesta inmune ante *E. histolytica* e incrementar el porcentaje de protección ante el reto de AHA.

Por otra parte, es necesario probar si la inmunización en mucosas con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3, es capaz de conferir protección en el modelo experimental de

amibiasis intestinal, debido a que es la forma inicial de infección por *E. histolytica* y la entidad clínica más común en la población.

Conclusiones

- ✚ El baculovirus recombinante AcNPV-LC3 utilizado como vector de vacunación sin adyuvante y administrado por mucosas (nasal y oral) y por vía intramuscular, es capaz de inducir una respuesta humoral y celular antígeno-específica.
- ✚ La inmunización con el baculovirus recombinante AcNPV-LC3 confirió protección ante el reto de absceso hepático amibiano con mayor eficiencia en los hámsteres inmunizados por vía oral e intramuscular.
- ✚ El grado de protección obtenido por la inmunización en mucosas con AcNPV-LC3 está directamente relacionado con la respuesta linfo-proliferativa antígeno-específica, por el contrario, la respuesta humoral no parecen estar relacionada a dicho fenómeno.
- ✚ En los hámsteres inmunizados y retados, el valor sérico de ALT y la expresión de IFN γ e IL-4 es inversa y directamente proporcional, respectivamente, al grado de protección conferida por la inmunización intramuscular con AcNPV-LC3.

Este trabajo permitió la siguiente publicación

Meneses-Ruiz DM, Laclette JP, Aguilar-Díaz H, Hernández-Ruiz J, Luz-Madrigal A, Sampieri A, Vaca L, Carrero JC. **Mucosal delivery of ACNPV baculovirus driving expression of the Gal-lectin LC3 fragment confers protection against amoebic liver abscess in hamster.** Int J Biol Sci. 2011;7(9):1345-56. Epub 2011 Nov 1.

Referencias

[No authors listed]. WHO: Geneva, Switzerland. 1997. Weekly Epidemiological Record. Amoebiasis from 4 April; 72:97-100.

Abd-Alla, MD., White, GL., Rogers, TB. y cols. 2007. Adherence-inhibitory intestinal immunoglobulin a antibody response in baboons elicited by use of a synthetic intranasal lectin-based amebiasis subunit vaccine. *Infect Immun*;75(8):3812-22.

Abd-Alla, MD., Jackson, TF., Soong, GC., y cols. 2004. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infect Immun*;72:3974–3980.

Abd-Alla, MD., Jackson, TF., Reddy, S. y cols. 2000. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol*;38(6):2344-7.

Abe, T., Matsuura, Y. 2010. Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. *Curr Gene Ther*;10(3):226-31. Review.

Abe T, Hemmi H, Miyamoto H y cols. 2005. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol*;79(5):2847-58.

Abe T, Takahashi H, Hamazaki H y cols. 2003. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol*;171(3):1133-9.

Abou-el-Magd I, Soong CJ, el-Hawey AM y cols. 1996. Humoral and mucosal IgA antibody response to a recombinant 52-kDa cysteine-rich portion of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin correlates with detection of native 170-kDa lectin antigen in serum of patients with amebic colitis. *J Infect Dis*;174(1):157-62.

Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R y cols. 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends Parasitol*;27(10):450-8.

Alcántara Vázquez, A. y cols. 2008. Fisiopatología de la amibiasis. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 78-86p.

Ali, IK., Clark, CG., Petri, WA. Jr. 2008. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol*;8(5):698-707.

Artis D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*;8, 411–420.

Asgharpour, A., Gilchrist, C., Baba, D. y cols. 2005. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ Cells. *Infection and Immunity*;73, 4522–4529.

Baxt, LA., Baker, RP., Singh, U., y cols. 2008. An *Entamoeba histolytica* rhomboid protease with atypical specificity cleaves a surface lectin involved in phagocytosis and immune evasion. *Genes Dev*;22(12):1636-46.

Belkaid, Y., Oldenhove, G. 2008. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*;29, 362–371.

Beving, DE., Soong, CJ., Ravdin, JI. 1996. Oral immunization with a recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has in vitro adherence inhibition activity. *Infect Immun*;64(4):1473-6.

Blazquez, S., Rigotherier, MC., Huerre, M., y cols. 2007. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. *Int J Parasitol*;37(3-4):425-33.

Braga, LL., Ninomiya, H., McCoy, JJ., y cols. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 1992; 90(3):1131-7.

Bruchhaus, I., Richter, S., Tannich, E., y cols. 1998. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH: flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochemical Journal*;330, 1217–1221.

Bruchhaus, I., Tannich, E. 1995. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein homologous to prokaryotic disulphide oxidoreductases. *Molecular and Biochemical Parasitology*;70, 187–191.

Bruchhaus, I., Tannich, E. 1994. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Molecular Biochemical Parasitology*;67, 281–288.

Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., y cols. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; 50(4):412-9.

Carrero, JC., Contreras-Rojas, A., Sánchez-Hernández, B., y cols. 2010. Protection against murine intestinal amoebiasis induced by oral immunization with the 29 kDa antigen of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin. *Exp Parasitol*;126(3):359-65.

Carrero, JC., Aguilar-Díaz, H., Díaz-Gallardo, MY., y cols. 2007. The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol*;29(7):331-8. Review.

Carrero, JC., Petrossian, P., Acosta, E., y cols. 2000. Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human secretory IgA antibodies. *Parasitol Res*;86(4):330-4.

Carrero, JC., Petrossian, P., Sánchez-Zerpa, M., y cols. 1997. A new isoform of the serine-rich *E. histolytica* protein recognized by human secretory IgA antibodies from patients with intestinal amebiasis. *Arch Med Res*;28 Spec No:259-61.

Carrero, J.C., Díaz, M.Y., Viveros, M., y cols. 1994. Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infect Immun*;62(2):764-7.

Chadee, K., Petri, Jr., W.A., Innes, D.J., y cols. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal Clinical Investigation*;80, 1245–1254.

Chadee, K., Meerovitch, E. 1985. *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*;34, 283–291.

Chávez-Munguía, B., Talamás-Rohana, P., Castañón, G., y cols. 2012. Differences in cap formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*. *Parasitol Res*;Jan 26.

Chen, C.Y., Wu, H.H., Chen, C.P., y cols. 2011. Biosafety assessment of human mesenchymal stem cells engineered by hybrid baculovirus vectors. *Mol Pharm*;8(5):1505-14.

Cheng, X.J., Tachibana, H., Kaneda, Y. 1999. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*;85(1):78-80.

Choi, M., Sajed, D., Poole, L., y cols. 2005. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and Biochemical Parasitology*;143, 80–89.

Clark, C.G. 1995. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *J Eukaryot Microbiol*;42 (5) 590-3.

Costa, AO., Gomes, MA., Rocha, AO., y cols. 2006. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 48(5):245-50.

Cox MM. 2012. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. Vaccine;30(10):1759-66.

Crispe, I.N. 2009. The liver as a lymphoid organ. Annual Reviews of Immunology;27, 147–163.

de Meester, F., Shaw, E., Scholze, H., y cols. 1990. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Infect Immun; 58 (5):1396-401.

Denis, M., Chadee, K. 1989. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. Journal of Leukocyte Biology; 46, 270–274.

Dey, I., Keller, K., Belley, A., y cols. 2003. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA;100, 13561–13566.

Diamond, LS., Clark, CG. 1993 A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol;40 (3):340-4.

Elnekave, K., Siman-Tov, R., Ankris, S: 2003. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. Parasite Immunol;25:597-608.

Feng Q, Liu Y, Qu X. y cols. 2006. Baculovirus surface display of SARS Coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models. DNA Cell Bio;25:668-673

Flores, BM., Batzer, MA., Stein, MA., y cols. 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.

Gaucher, D., Chadee, K. 2003. Prospect for an *Entamoeba histolytica* Gal-lectin-based vaccine. *Parasite Immunol*;25(2):55-8.

Georgopoulos, LJ., Elgue, G., Sanchez, J., y cols. 2009. Preclinical evaluation of innate immunity to baculovirus gene therapy vectors in whole human blood. *Mol Immunol*;46(15):2911-7.

Ghadirian, E., Somerfield, S.D., Kongshavn, P.A. 1986. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. *Infection and Immunity*;51, 263–267.

Ghosh, S., Parvez, MK., Banerjee, K., y cols. 2002. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol Ther*;6(1):5-11. Review.

Gonzales, ML, Dans LF, Martinez EG. 2009. Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev*;(2):CD006085. Review.

Granados, RR., Lawler, KA. 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*;108(2):297-308.

Grazia Roncarolo, M., Bacchetta, R., Bordignon, C., y cols. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews*;182, 68–79.

Guo, X., Barroso, L., Lyerly, DM., y cols. 2011. CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*;29(4):772-7.

Guo, X., Barroso, L., Becker, SM., y cols. 2009. Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon. *Infect Immun*;77 (9):3909-18.

Gutierrez-Alarcon, A., Moguel-Torres, M., Mata-Leyva, O., y cols. 2006. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp Parasitol*;114:154-159.

Hamano, S., Asgharpour, A., Stroup, S.E., y cols. 2006. Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *Journal of Immunology*;177, 1208–1213.

Haque, R., Mondal, D., Shu, J., y cols. 2007. Correlation of interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*;76, 340–344.

Haque, R., Mondal, D., Duggal, P., y cols. 2006. *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amoebiasis. *Infection and Immunity*;74, 904–909.

Haque, R., Ali, I.M., Sack, R.B., y cols. 2001. Amoebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*;183, 1787–1793.

Harizi, H., Juzan, M., Grosset, C., y cols. 2001. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol*;209 (1):19-28.

Harrison, TR., y cols. 1998. *Principios de Medicina Interna*. 14^a edición. Interamericana de España, S. A. U. Editorial McGraw-Hill, 1889-1892p.

Hernández-Ramírez, VI., Rios, A., Angel, A., y cols. 2007. Subcellular distribution of the *Entamoeba histolytica* 140 kDa FN-binding molecule during host-parasite interaction. *Parasitology*;134(Pt 2):169-77.

Hervas-Stubbs, Rueda, P., Lopez, L., y cols. 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J Immunol*;178:2361–2369.

Hitchman RB, Possee RD, King LA. 2009. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol*;3(1):46-54.

Hofmann, C., Strauss, M. 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther*;5(4):531-6.

Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., y cols. 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92(22):10099-103.

Houpt, E., Barroso, L., Lockhart, L., y cols. 2004. Prevention of intestinal amebiasis by vaccination with the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Vaccine*;22(5-6):611-7.

Houpt, ER., Glembocki, DJ., Obrig, TG., y cols. 2002. The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol*;169:4496-4503.

Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., y cols. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*;71, 964–972.

Ivory, CP., Chadee, K. 2007. Intranasal Immunization with Gal-Inhibitable Lectin plus an Adjuvant of CpG Oligodeoxynucleotides Protects against *Entamoeba histolytica* Challenge. *Infect Immun*;4917–4922.

Ivory, C.P., Chadee, K. 2007. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *European Journal of Immunology*;37, 385–394.

Ivory, CP., Chadee, K. 2006. CpG-Oligodeoxynucleotide Is a Potent Adjuvant with an *Entamoeba histolytica* Gal-Inhibitable Lectin Vaccine against Amoebic Liver Abscess in Gerbils. *Infect Immun*;528–536.

Kaba SA, Hemmes JC, van Lent JW. y cols. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria parva* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Eng*;16:73-78

Kammanadiminti, S.J., Chadee, K. 2006. Suppression of NF- κ B Activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27. *Journal of Biological Chemistry*;281, 26112–26120.

Kelsall, B.L., Ravdin, J.I. 1993. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases*;168, 1319–1322.

Koppers-Lalic, D., Hoeben, RC. 2011. Non-human viruses developed as therapeutic agent for use in humans. *Rev Med Virol*;21(4):227-39.

Lee, J., Park, S.J., Yong, TS. 2000. Serodiagnosis of amoebiasis using a recombinant protein fragment of the 29 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*;30(14):1487-91.

Lin, J.Y., Chadee, K., 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology*;148, 3999–4005.

Lotter, H., Gonzalez-Roldan, N., Lindner, B., y cols. 2009. Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS Pathogens*;5, e1000434.

Lotter, H., Rüssmann, H., Heesemann, J., y cols. 2008. Attenuated recombinant *Yersinia* as live oral vaccine carrier to protect against amoebiasis. *Int J Med Microbiol*;298(1-2):79-86.

Lotter, H., Rüssmann, H., Heesemann, J., y cols. 2004. Oral vaccination with recombinant *Yersinia enterocolitica* expressing hybrid type III proteins protects gerbils from amebic liver abscess. *Infect Immun*;72(12):7318-21.

Lotter, H., Khajawa, F., Stanley, S.L. Jr., y cols. 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.

Lotter, H., Zhang, T., Seydel, K.B., y cols. 1997. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *Journal of Experimental Medicine*;185, 1793–1801.

Luz-Madrigo, A., Clapp, C., Aranda, J., y cols. 2007. In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter. *Virology*;18;4:88.

Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F., y cols. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*;1, 11–22.

Madhan, S., Prabakaran, M., Kwang, J. 2010. Baculovirus as vaccine vectors. *Curr Gene Ther*;10(3):201-13.

Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C.J., Rosenstein, Y., y cols. 2005. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol*;27(4):127-37.

Mann, B.J., Burkholder, B.V., Lockhart, L.A. 1997. Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine*;15: 659-63.

Martínez, M.B., Rodríguez, M.A., García-Rivera, G., y cols. 2009. A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine*;27(31):4176-86.

Martínez-García, M.C., Muñoz, O., Garduño-Rodríguez, G., y cols. 1990. Pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* in a rural area of Mexico. Concordance with serology. *Arch Invest Med (Mex)*;21 Suppl 1:147-52

Martinez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A., De la Torre, M. 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced con A. Nat New Biol;245(145):186-7.

Mena, JA., Kamen, AA. 2011. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. Expert Rev Vaccines;10(7):1063-81. Review.

Mortimer L., Chadee, K. 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol;126(3):366-80.

Murray, H.W., Aley, S.B., Scott, W.A. 1981. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. Molecular and Biochemical Parasitology;3, 381–391.

Oker-Blom C, Airene KJ, Grabherr R. 2003. Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. Brief Funct Genomic Proteomic;2(3):244-53. Review.

Orozco E, López C, Gómez C y cols. 2002. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int. 2002 Dec;51(4):353-9.

Peralta A, Molinari P, Conte-Grand D. y cols. 2007. A chimeric bacu-lovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. Appl Microbiol Biotechnol;75:407-414

Petri, WA. Jr., Chaudhry, O., Haque, R., y cols. 2006. Adherence-blocking vaccine for amebiasis. Arch Med Res;37(2):288-91.

Petri, WA. Jr., Jackson, TF., Gathiram, V., y cols. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infect Immun;58(6):1802-6.

Prabakaran, M., Madhan, S., Prabhu, N., y cols. 2010. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. J Virol;84(7):3201-9.

Prabakaran M, Velumani S, He F. y cols. 2008. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant. *Virology*;380:412-20

Rahman MM, Shaila MS, Gopinathan KP. 2003. Baculovirus display of fusion protein of Peste des petits ruminants virus and he-magglutination protein of Rinderpest virus and immunogenic-ity of the displayed proteins in mouse model. *Virology*;317:36-49

Ralston, KS., Petri, WA. Jr. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol*;27(6):254-63.

Ravdin, J.I., Abd-Alla, M.D., Welles, S.L., y cols. 2003. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infection and Immunity*;71, 6899–6905.

Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., y cols. 1988. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*;56, 1505–1512.

Ravdin, J. I. (1988). *Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*. Nueva York, USA: Wiley Medical Publication, 13-26p.

Ravdin, JI., Murphy, CF., Salata, RA., y cols. 1985. N-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J Infect Dis*;151(5):804-15.

Reed, SL., Ember, JA., Herdman, DS., y cols. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol*;155(1):266-74.

Reed, .SL., Flores, BM., Batzer, MA., y cols. 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.

Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., y cols. 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology*;143, 189–195.

Reed, S.L., Curd, J.G., Gigli, I., y cols. 1986. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology*;136, 2265–2270.

Riahi, Y., Simon-Tov, R., Ankri, S. 2004. Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase inhibitor gene from *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*;133, 153–162.

Rico, G., Leandro, E., Rojas, S., y cols 2003. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res*;90:264-267.

Rigothier, M., Khun, H., Tavares, P., y cols. 2002. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infection and Immunity*;70, 3208–3215.

Rojas-Dotor, S., Rico, G., Perez, J., y cols, 2006. Cytokine expression in CD4(+) cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*;98:493-495.

Romero-Cabello, R. (2008). *Aspectos históricos de la amibiasis*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 11-28p.

Ruiz, P.A., Shkoda, A., Kim, S.C., y cols. 2005. IL-10 gene-deficient mice lack TGF- β /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *Journal of Immunology*;174, 2990–2999.

Ryan, ET., Butterton, JR., Zhang, T., y cols. 1997. Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the *cholera toxin* B subunit induces systemic and

mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. *Infect Immun*;65(8):3118-25.

Saffer, L.D., Petri Jr., W.A. 1991. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infection and Immunity*;59, 4681–3.

Salata, R.A., Martinez-Palomo, A., Murray, H.W., y cols. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell mediated responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology*;136, 2633–2639.

Salata, R.A., Ravdin, J.I. 1986. Interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* and increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. *Journal of Infectious Diseases*;154, 19–26.

Santi-Rocca, J., Rigother, MC., Guillén, N. 2009. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev*;22(1):65-75. Review.

Sargeant, PG., Williams, JE., Grene, JD. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;72(5):519-21.

Sateriale, A., Huston, CD.. 2011. A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol Res*;2011:926706.

Schütz A, Scheller N, Breinig T, Meyerhans A. 2006. The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus AcNPV induces functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine*;24(49-50):7190-6.

Schwerbrock, N.M., Makkink, M.K., van der Sluis, M., y cols. 2004. Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflammatory Bowel Diseases*;10, 811–823.

Sengelov, H. 1995. Complement receptors in neutrophils. *Annu Rev. Immunol*;15:107-131.

Seydel, K.B., Li, E., Swanson, P., y cols. 1997. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse–human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*;65, 1631–1639.

Seydel, K.B., Zhang, T., Stanley, S.L. 1997. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity*;65, 3951–3953.

Shibayama, .M., Dolabella, SS., Silva, EF., y cols. 2007. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. *Ann Hepatol*;6(2):117-8.

Shoji, I., Aizaki, H., Tani, H., y cols. 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*;78:2657-2664.

Sim, S., Yong, TS., Park, SJ., y cols. 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*;174(7):4279-88.

Siman-Tov, R., Ankri, S. 2003. Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*;89(2):146-9.

Slack, J., Arif, BM. 2008. The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res*;69:99-165. Review.

Slack, J., Arif, BM. 2007. The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res*;69:99-165. Review

Solaymani-Mohammadi, S., Petri, WA. Jr. 2008. Intestinal invasion by *Entamoeba histolytica*. *Subcell Biochem*; 47:221-32.

Soong, CJ., Kain, KC., Abd-Alla, M., y cols. 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.

Soong, CJ., Torian, BE., Abd-Alla, MD., y cols. 1995. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun*;63(2):472-7.

Stanley SL Jr. 1997. Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clin Microbiol Rev*;10(4):637-49. Review.

Stanley, SL., Jackson, SL., Reed, J., y cols. 1991. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA*;266:1984–1986.

Stanley, SL., Becker, C., Kunz-Jenkins, L., y cols. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci*;87:4976– 4980.

Strachan, WD., Chiodini, PL., Spice, WM., y cols. 1988. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet*;1(8585):561-3.

Strauss R., Hüser A, Ni S. y cols. 2007. Baculovirus-based vaccination vector a low for efficient induction of immune responses against *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Mol Ther.* 2007;15:193-202.

Sultan, F., Jin, LL., Jobling, MG., y cols. 1998. Mucosal immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A2 domain of cholera toxin. *Infect Immun*;66(2):462-8.

Syed, MS., Kwang, J. 2011. Oral vaccination of baculovirus-expressed VP28 displays enhanced protection against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. *PLoS One*;6(11):e26428.

Tannich, E., Horstmann, RD., Knobloch, J., y cols. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*;86(13):5118-22.

Tay Zavala J. 2008. Morfología y biología de *Entamoeba histolytica*. En *Amibiasis en el siglo XXI*. 1ª edición. D.F., Mexico: Editorial IDISA, 57-63p.

Teixeira, JE., Huston, CD. 2008 Participation of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in amebic phagocytosis of apoptotic host cells. *Infect Immun*;76(3):959-66.

Teixeira, JE., Mann, BJ. 2002. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. *Infect Immun*;70(4):1816-23.

Thomson, AW., Knolle, PA. 2010. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*;10(11):753-66. Review.

Torian, BE., Flores, BM., Stroehler, VL., y cols. 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.

Tran, V.Q., Herdman, S., Torian, B.E., y cols. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *Journal of Infectious Diseases*;177, 508–511.

Tsutsumi V, Shibayama M. 2006. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res*;37(2):210-20.

Utrera-Barillas, D., Velazquez, JR., Enciso, A., y cols. 2003. An antiinflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* downregulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunol*;25:475-482.

van Oers, MM., Vlak, JM. 2007. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets*;8(10):1051-68. Review.

Velin, D., Bachmann, D., Bouzourene, H., y cols. 2005. Mast cells are critical mediators of vaccine-induced *Helicobacter* clearance in the mouse model. *Gastroenterology*;129(1):142-55.

Ventura-Juarez, J., Campos-Rodriguez, R., Jarillo-Luna, R.A., y cols. 2009. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. *Parasitology Research*;104, 821–826.

Volkman, LE., Goldsmith, PA. 1981. Baculovirus bioassay not dependent upon polyhedra production. *J Gen Virol*;56(Pt 1):203-6.

Walsh, JA. 1986. Amebiasis in the world. *Arch Invest Med (Mex)*;17 Suppl 1:385-9.

Wang, W., Chadee, K. 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-Ab Mrna expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infection and Immunity*;63, 1089–1094.

William E. Paul y cols. (2003). *Fundamental Immunology. The Mucosal Immune system* Sixth edition. Philadelphia, USA. Editorial.Lippincott Williams & Wilkins. 983-1029p.

Wu Q, Fang L, Wu X. y cols. 2009. A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens. *Mol Immunol*;46:2210-7

Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., y cols. 2011. Novelty on amoebiasis: a neglected tropical disease. *J Glob Infect Dis*;3(2):166-74.

Ximénez, C., Cerritos, R., Rojas, L., y cols. 2010. Human amoebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health*;7(3):1105-20.

Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., y cols. 2009. Reassessment of the epidemiology of amoebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol*;9(6):1023-32.

Xu, H., Yao, L., Lu, S., y cols. 2007. Host filamentous actin is associated with *Heliothis armigera* single nucleopolyhedrosis virus (HaSNPV) nucleocapsid transport to the host nucleus. *Curr Microbiol*;54(3):199-206.

Yoshida S, Araki H, Yokomine T. 2010. Baculovirus-based nasal drop vaccine confers complete protection against malaria by natural boosting of vaccine-induced antibodies in mice. *Infect Immun*;78:595-602

Yoshida, S., Kawasaki, M., Hariguchi, N., y cols. 2009. A baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice. *Infect Immun*;77(5):1782-9.

Yoshida S, Kondoh D, Arai E. y cols. 2003. Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*;316:161-70

Yu, Y., Chadee, K. 1997. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology*;112(5):1536-47.

Zhang, T., Stanley, SL. 1999. DNA vaccination with the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine*;18(9-10):868-74.

Zhang, T., Stanley, SL. 1997. Expression of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 chi 4297 (delta cya delta crp delta asd): safety and immunogenicity in mice. *Vaccine*;15(12-13):1319-22.

Zhang, T., Stanley, SL. 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.

Zhang, T., Li, E., Stanley, SL. 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.

Zhang, T., Cieslak, PR., Foster, L., y cols. 1994. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunol*;16(5):225-30.

Zhang, T., Cieslak, PR., Stanley, SL. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun*;62(4):1166-70.

Zhou, P., Streutker, C., Borojevic, R. y cols. 2004. IL-10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy. *American Journal of Physiology*;287, G599–G604.