

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Caracterización de la respuesta inmune inducida por los
genes codificantes del complejo EhCPADH de *E. histolytica*
en el modelo de abscesos hepático en hámster**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

M. en C. Máximo Berto Martínez Benitez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. MARIA ESTHER OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F.

JULIO 2009

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en los laboratorios 1 y 2 del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y en el laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco, con la asesoría del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez (CINVESTAV-IPN), Dr. Rogelio Hernández Pando (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán), Dr. Mario César López Camarillo (UACM) y el Dr. Mauricio Castañón Arreola (UACM), con el apoyo del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y el CONACYT.

Dedico esta tesis

A mi hijo

Dayan Martínez Sotolongo

Por todo el tiempo que no he estado junto a él.

A mis padres

Máximo Fernando Martínez y Virginia Benitez Frias

*Por el apoyo y amor que siempre me han brindado, por inculcarme los principios
de honestidad y responsabilidad.*

A mi esposa

Anabell Ramos Trujillo

*Por ser mi compañera, por siempre tener una respuesta frente a los problemas y
por no dejarme caer nunca ante ellos.*

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a la Dra. María Esther Orozco Orozco, directora de esta Tesis Doctoral, por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación ofreciéndome la posibilidad de desarrollar este trabajo, por sus consejos, su ayuda y su paciencia durante la ejecución del trabajo experimental. Porque a pesar de sus múltiples compromisos y responsabilidades, siempre ha encontrado el espacio para discutir los resultados experimentales y encausarlos en el camino correcto. Por toda la confianza depositada en mí. Por todo su apoyo y oportunidades para mi crecimiento personal y profesional.

También quiero darle las gracias al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, por haberme acogido en su laboratorio, por sus valiosos consejos y por su continuo respaldo durante todo el desarrollo de la tesis. Por toda la ayuda aportada durante la revisión del artículo y el documento de la tesis.

Agradezco al Dr. Rogelio Hernández Pando, por su generosidad al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos. Por sus valiosos consejos científicos y toda la ayuda suministrada para el desarrollo de este trabajo.

A los Doctores Mario César López Camarillo y Mauricio Castañón Arreola, por sus oportunos consejos, por todas las críticas y observaciones realizadas que han permitido enriquecer este trabajo.

A mis colegas y amigos Alfonso Olivos, Mario Nequis y Espiridión del laboratorio del Dr. Ruy Pérez Tamallo, quienes amablemente me

proporcionaron la cepa de amiba (HM1:IMSS) con la cual realicé los experimentos de reto y por los consejos proporcionados.

A la Dra. Xochilt Madriz García, con quien inicié este trabajo y por su amistad durante todos estos años.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en especial al posgrado en Ciencias Genómicas y su colegio de profesores integrado por los doctores Minerva Camacho, Elizabeth Alvarez, Martha Yocupicio, Elisa Azuara, Sara Frias, Mavil López, Lorena Orozco, Zelene Zarate, Mario César López, José de Jesús Olivarez, Mauricio Castañón y Humberto Nicolini, de quienes siempre he recibido apoyo a lo largo de este trabajo.

A todos los estudiantes del posgrado en Ciencias Genómicas, porque de ellos he aprendido mucho.

A todos aquellos que han sido mis compañeros de laboratorio durante la realización de este trabajo, Guillermina García Rivera, Eduardo Flores, Israel López, Eduardo Carrillo, Silvia Castellanos, Cecilia Bañuelos, Tomás Sanchez, Esther Herrera, Jonnatan Pais, Rosa María García, Mónica Romero, Carina Picazarri, Andrés Salas, Ramón Ocadiz, Carolina Martínez, Alejandro García, Ramón Ocadiz (hijo), Mercedes Calixto y Wendy Fonseca.

Este trabajo no hubiese sido posible sin la excelente asistencia técnica de Alejandrina Reyes y Alberto García.

Agradezco la ayuda proporcionada por Catalina Sánchez, Rocío Guerrero y Lourdes Rodríguez.

Al diseñador Alfredo Padilla, por su valiosa ayuda con las figuras presentadas en este trabajo y por su incondicional amistad de muchos años.

A los doctores Rossana Arroyo y Jaime Ortega, por los consejos transmitidos.

A los Doctores Gustavo Sierra, Armando Acosta y María Elena García, de quienes me enseñaron mucho de lo que he puesto en práctica durante la realización de este trabajo.

Por último, pero no menos importante agradezco a mi familia, en especial a mi suegra Diega Trujillo, a Pedro Estévez y a Angélica Amador, por todo el apoyo que de ellos he recibido durante estos años, que me ha servido para sortear los obstáculos y seguir adelante con mi carrera profesional.

A todos muchas gracias.

Lista de abreviaturas

$\Delta\Delta CT$	Método de cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real.
AHA	Absceso hepático amibiano.
Balb/c	Cepa de ratones albinos.
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin.
bp	Pares de bases.
BSA	Albúmina de suero bovino.
C3a	Anafilotoxina 3a del sistema del complemento.
C3H	Línea consanguínea de ratones.
C5a	Anafilotoxina 5a del sistema del complemento.
C5b-9	Complejo terminal del sistema del complemento.
C8	Componente 8 del sistema del complemento.
C9	Componente 9 del sistema del complemento.
CAM	Complejo de ataque a la membrana (Sistema del complemento).
CD4	Grupo de diferenciación 4 (cluster of differentiation).
CD59	Grupo de diferenciación 59 (cluster of differentiation).
CD59	Grupo de diferenciación 59 (cluster of differentiation).
CD8	Grupo de diferenciación 8 (cluster of differentiation).
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario.
CHO	Células de Ovario de Hámster Chino (Chinese Hamster Ovary Cells)

ConA	Concanabalina A.
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
CP	Cisteína proteasas.
CT	Primer ciclo de la PCR en tiempo real donde se detecta producto amplificado.
CTB	Subunidad B de la tóxina del cólera.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAsa	Desoxirribonucleasa.
dNTP	Desoxirribonucleótido.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
Ehserp	Serpinas de <i>Entamoeba histolytica</i> .
ELISA	Inmunoensayo enzimático ligado a una enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
EUA	Estados Unidos Americanos.
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
HSP	Proteínas de estrés térmico.
IgA	Inmunoglobulinas de clase A.
IgG	Inmunoglobulinas de clase G.
IL-1	Interleucina 1.
IL-10	Interleucina 10.

IL-18	Interleucina 18.
IL-2	Interleucina 2.
IL-4	Interleucina 4.
IL-6	Interleucina 6.
IL-8	Interleucina 8.
INF- γ	Interferon gamma.
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible.
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosido.
kDa	Kilodaltones.
KLH	Hemocianina de la rótula (keyhole-limpet-hemocyanin).
LB	Medio Luria-Bertani.
LC3	Fragmento (aminoácidos del 758 al 1150) de la subunidad pesada de la lectina de 260 kDa de <i>E. histolytica</i> .
LecA	Fragmento (aminoácidos del 578 al 1154) de la subunidad pesada de la lectina de 260 kDa de <i>E. histolytica</i> .
LPG	Lipofosfoglicano.
LPS	Lipopolisacáridos.
MBP	Proteína de unión a maltosa.
MDCK	Línea celular aislada de rion de perro (Madin Darby canine kidney cell).
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase 2.
MIF	Factor inhibidor de la migración.
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfonico .

NADPH	Forma reducida de la coenzima nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato.
NO	Oxido nítrico.
OMS	Organización mundial de la salud (WHO, World Health Organization).
OPD	Ortofenilendiamino.
OPS	Organización panamericana de la salud.
PBS	Tampón fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGE2	Prostaglandina E2.
PMN	Células polimorfonucleares.
PPG	Proteofosfoglicano.
RGD	Dominio arginina-glicina-aspártico de unión a integrinas.
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero.
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal.
RNAsa	Ribonucleasa.
RNI	Intermediarios reactivos del nitrógeno (reactive nitrogen intermediates.)
ROI	Intermediarios reactivos del oxígeno (reactive oxygen intermediates).
rpm	Revoluciones por minutos.
RPMI	Medio de cultivo para linfocitos (Roswell Park Memorial Institute medium).

RT-PCR	Reacción de retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa.
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada.
SCID-HU-INT	Cepa de ratón con inmunodeficiencia severa combinada humanizado con senotransplante de intestino humano (SCID mouse-human intestinal xenograft).
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida usando dodecilsulfato de sodio.
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> .
TBE	Tampón Tris-ácido bórico-EDTA.
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta).
Th1	Células T cooperadoras de tipo 1.
Th2	Células T cooperadoras de tipo 2.
TLR	Receptor tipo Toll (Toll-like receptor).
Tm	Temperatura de fusión (Melting temperature).
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TYI-S-33	Medio de cultivo con tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino para el cultivo axénico de <i>E. histolytica</i> .
U.V	Ultravioleta.

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Figura 2. Análisis de los plásmidos *pcDNA3*, *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Figura 3. Expresión y purificación de la proteína recombinante EhCP112.

Figura 4. Expresión y purificación de la proteína recombinante EhADH243.

Figura 5. Expresión de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en los hámsteres inmunizados.

Figura 6. Expresión *in vivo* de las proteínas EhCP112 y EhADH112.

Figura 7. Respuesta inmune humoral de los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Figura 8. Respuesta linfoproliferativa a partir de células esplénicas totales de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Figura 9. Niveles de expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados.

Figura 10. Daño hepático en los hámsteres siete días después del reto con trofozoitos amibianos virulentos.

Figura 11. Sobrevida de los hámsteres después del reto con trofozoitos amibianos virulentos.

Figura 12. Respuesta inmune humoral de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos y retados con trofozoitos virulentos.

Figura 13. Respuesta linfoproliferativa después del reto, evaluada en células esplénicas totales de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112*.

Figura 14. Niveles de expresión del RNAm de las citocinas en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112* y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos.

Figura 15. Niveles de expresión del RNAm del gen que codifica para la enzima iNOS en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112* y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos.

Figura 16. Niveles de expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β y del gen de la enzima iNOS en hígados de hámsteres inmunizados intradérmicamente y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos.

Figura 17. Niveles de expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β y del gen de la enzima iNOS en hígados de hámsteres inmunizados intramuscularmente y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos.

Resumen

Las vacunas de DNA son una herramienta prometedora para luchar contra las enfermedades parasitarias, incluyendo la amibiasis, la cual es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La molécula de superficie EhCPADH de este parásito está involucrada en la virulencia del trofozoito amibiano. Esta molécula es un complejo formado por una adhesina (EhADH112) y una cisteína proteinasa (EhCP112). En este estudio, evaluamos la inmunogenicidad y la eficacia protectora de una vacuna de DNA compuesta por los genes codificantes del complejo EhCPADH (*Ehcp112* y *Ehadh112*). Primeramente evaluamos las rutas de inoculación intramuscular e intradérmica en hámsteres inmunizados con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*. Los resultados de RT-PCR e inmunohistoquímica mostraron que ambos antígenos se expresan de forma diferencial en la piel, el músculo, el bazo y el hígado de los animales inmunizados. No se obtuvo una respuesta inmune humoral significativa por ninguna de las rutas de inoculación estudiadas. Sin embargo, la inoculación intradérmica de los hámsteres con la mezcla de plásmidos codificando para ambos antígenos amibianos, indujo una respuesta inmune celular robusta de tipo Th1 en el hígado de los hámsteres vacunados y retados con trofozoitos virulentos. También observamos un alto nivel de protección y supervivencia asociada a esta respuesta inmune celular. Concluimos que un refinamiento de esta vacuna de DNA pudiera ser una buena opción para el control de la amibiasis hepática.

Abstract

DNA vaccines are a promising tool to fight parasitic diseases, including amoebiasis caused by the eukaryotic protozoan *Entamoeba histolytica*. The EhCPADH surface molecule of this parasite is involved in the trophozoite virulence. It is a complex formed by an adhesin (EhADH112) and a cysteine proteinase (EhCP112). In this study, we evaluated the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine composed of EhCPADH encoding genes (*Ehcp112* and *Ehadh112*). We first evaluated the intradermal and intramuscular delivery routes in hamsters immunized with the *pcDNA-Ehadh112* and *pcDNA-Ehcp112* plasmids mixture. Our RT-PCR and immunohistochemical staining results showed that both antigens were differentially expressed in skin, muscle, spleen and liver of immunized animals. No significant antibody immune response was obtained for none of the two routes. However, intradermal inoculation of hamsters with a plasmid mixture coding for both antigens, induced a robust Th1 immune response in liver of hamsters vaccinated and challenged with virulent trphozoites as well as high protection and survival rate associated to this immune response. We conclude that a refinement of this DNA vaccine could be a good choice to control hepatic amoebic disease.

Indice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Clasificación taxonómica y filogenia.....	5
1.3 Epidemiología.....	7
1.4 Morfología.....	11
1.5 Ciclo de vida.....	13
1.6 Organización genómica.....	15
1.7 Patogenia.....	16
1.8 Manifestaciones clínicas.....	23
1.9. Respuesta inmune frente a <i>E. histolytica</i>	27
1.9.1 Respuesta inmune innata.....	27
1.9.2 Respuesta inmune específica.....	33
1.9.3 Estrategias vacunales contra <i>E. histolytica</i>	44
2. Justificación.....	60
3. Hipótesis.....	62
4. Objetivos.....	63
5. Materiales y métodos.....	64
5.1. Plásmidos.....	64
5.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	64
5.3. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	65
5.4. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	66

5.5 Purificación de DNA plasmídico.	67
5.6. Análisis de DNA plasmídico en geles de agarosa.	68
5.7. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243.	69
5.8. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	71
5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras usando el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).	72
5.10. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.	73
5.11. Ensayos de inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa (Western blot).....	73
5.12. Animales y esquemas de inmunización.	75
5.13. Evaluación de la expresión <i>in vivo</i> del RNAm de los genes <i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i> en hámsteres inmunizados.	75
5.13.1. Obtención de RNA total.	76
5.13.2. Análisis de la expresión de los genes <i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i> mediante PCR en tiempo real.	77
5.14. Análisis de la expresión <i>in vivo</i> de las proteínas EhCP112 y EhADH112 mediante inmunohistoquímica.	78
5.15. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	80
5.16. Reto de los hámsteres con trofozoitos de la cepa HM1:IMSS	81
5.17. Análisis de la respuesta inmune humoral mediante ELISA.....	82

5.18. Ensayo de linfoproliferación celular usando esplenocitos totales de hámsteres.....	83
5.19. Análisis de la expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β y del gen de la enzima iNOS mediante RT-PCR en tiempo real.	85
5.19.1. Síntesis de cDNA.....	85
5.19.2. Amplificación de los genes INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β e iNOS.	86
5.20. Análisis estadístico.	87
6. Resultados.....	89
6.1. Análisis de restricción de los plásmidos <i>pcDNA3</i> , <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	89
6.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinates EhCP112 y EhADH243.	91
6.3. Expresión <i>in vivo</i> de los genes <i>Ehcp112</i> y <i>Ehadh112</i> después de la inmunización de hámsteres con la mezcla de plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	95
6.4. Expresión <i>in vivo</i> de las proteínas EhCP112 and EhADH112 después de la inmunización de hámsteres con la mezcla de plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	97
6.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral específica antes del reto en hámsteres inoculados con la mezcla de plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	99
6.6. Respuesta inmune celular inducida en los hámsteres inmunizados con la mezcla de plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	103

6.7. Evaluación del patrón de citocinas en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.....	105
6.8. Daño hepático producido por los trofozoitos virulentos de <i>E. histolytica</i> en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular. ...	107
6.9. Supervivencia de los animales inoculados por la ruta intradérmica o intramuscular con la vacuna <i>pcDNA-Ehcpadh</i> después de un reto con trofozoitos amibianos virulentos.....	110
6.10. Respuesta inmune humoral después del reto con trofozoitos virulentos en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular. ...	112
6.11. Respuesta inmune celular después del reto con trofozoitos virulentos en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular. ...	115
6.12. Evaluación del patrón de citocinas en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular después del reto.....	116
6.13. Evaluación de los niveles de iNOS después del reto, en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.	119
7. Discusión	126
7.1. Expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH112 y sus respectivos RNAm en diferentes órganos después de la inoculación intradérmica o intramuscular de la mezcla de plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh12</i>	127

7.2. Respuesta inmune inducida en los hámsteres inoculados por la ruta intradérmica o intramuscular con la mezcla de los plásmidos <i>pcDNA-Ehcp112</i> y <i>pcDNA-Ehadh112</i>	132
7.2.1. Respuesta inmune humoral.	134
7.2.2. Respuesta inmune celular.	137
7.3. Protección contra la formación AHA.....	144
8. Conclusiones.....	147
9. Perspectivas.....	148
10. Bibliografía.....	149

1. Introducción

1.1 Introducción

Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define a la amibiasis: “como la condición de portar el parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas” (WHO Bulletin, 1969).

La amibiasis es una enfermedad con distribución mundial, principalmente en países tropicales con climas cálidos y deficientes condiciones sanitarias. Es más frecuente en áreas con mayor pobreza, con agua contaminada, deficiente manejo de basura y deficiente sistema de drenaje. En estas regiones la prevalencia está entre el 30-50% (Walsh, 1986). Se estima que esta enfermedad afecta a 50 000 000 de personas anualmente de las cuales aproximadamente 100 000 mueren por las complicaciones causadas por este protozoo parásito (WHO, 1997).

El agente etiológico de la amibiasis, *E. histolytica* fue descrito por Rösel van Rosenhof desde el siglo XVII, pero fue el científico Ruso Frederick Lösch quien describe por primera vez la enfermedad de disentería amibiana en San Petersburgo en el año 1875, mientras que el nombre de *E. histolytica* le fue asignado por Schaudin en el año 1903, fundamentándose en la capacidad que posee este parásito de lisar tejidos y producir úlceras intestinales. Sin embargo, no fue hasta el año 1925 en que Brumpt propone basado en datos epidemiológicos la existencia de la especie *E.*

histolytica (el la denominó *E. dysenteriae*) como especie patógena invasiva y una especie morfológicamente relacionada pero no invasiva (*E. dispar*), datos que fueron virtualmente olvidados hasta que en 1978 se retoma la idea de la existencia de dos especies relacionadas por Sargeant, quien analizó el patrón electroforético de las isoenzimas de la hexoquinasa de *E. histolytica*, logrando determinar dos patrones electroforéticos diferentes “zimodemos patógenos” y “zimodemos no patógenos” (Sargeant y col., 1978). El autor, en conjunto con otros investigadores de Estados Unidos, México, Europa, Israel, India, Japón y Sur Africa, estudió la distribución mundial de los zimodemos del parásito en alrededor de 10 000 casos de amibiasis. Todos los pacientes con amibiasis invasiva estaban infectados con amibas que presentaban zimodemos patógenos y aquellos con infecciones asintomáticas tenían zimodemos patógenos y no patógenos. Estos resultados condujeron a Sargeant a postular en 1982 que en la amibiasis estaban involucradas dos especies, una patógena y otra no patógena, y que la propuesta de Brumpt era correcta y debía ser aceptada (Sargeant y col., 1982). Estudios que relacionaban la interacción entre el parásito y el hospedero, comparando los resultados de zimodemos con los datos clínicos, epidemiológicos y serológicos, demostraron que en individuos con amibiasis asintomática el 10 % estaba infectado con *E. histolytica*, mientras que el 90 % albergaba *E. dispar* (Gathiram y Jackson, 1985) y en pacientes con amibiasis sintomática o invasiva observaron que

la respuesta serológica se asocia a los zimodemos patógenos, pero no a los no patógenos (Jackson y col., 1985).

Estudios genéticos posteriores han demostrado una divergencia genómica entre las dos amibas (Tannich y col., 1989), lo que constituye una evidencia adicional de la existencia de dos especies que pueden ser diferenciadas por métodos bioquímicos, inmunológicos y genéticos. Sin embargo, aún cuando la existencia de dos especies con comportamiento diferencial esclarece la causa de la falta de correlación entre el número de infectados y el número de enfermos, no resuelve la incógnita de cuales son los factores que inducen a *E. histolytica* a invadir los tejidos.

El redescubrimiento de la especie *E. dispar* impone cambios drásticos en la epidemiología de la amibiasis. Con anterioridad se había estimado que el 10% de la población mundial estaba infectada con *E. histolytica*, que solamente el 10% de los infectados desarrollaban la enfermedad y que 500 millones de personas en el mundo se infectaban anualmente (Walsh, 1986). A la luz de la existencia de dos especies dentro de lo que clásicamente se diagnosticaba como *E. histolytica*, se puede estimar que el 90% de estos individuos están infectados por *E. dispar* y sólo el otro 10% alberga *E. histolytica* (Gathiram y Jackson, 1985, Ravilin y col., 1990) dentro de los cuales uno de cada diez desarrolla la enfermedad (Gathiram y Jackson, 1987). Por lo que en resumen, los individuos infectados se reducen a 50 millones por año, de los cuales 5 millones (10%) desarrollan la enfermedad.

También ha tenido impacto en las técnicas de diagnóstico y en el tratamiento que se venía aplicando para esta enfermedad, ya que hasta 1996 la identificación de quistes y trofozoitos amibianos se realizaba mediante la observación microscópica, pero ésta no permite establecer diferencias morfológicas entre las dos especies, por lo que para ello se han implementado nuevas técnicas como el análisis de isoenzimas (Sargeant y col., 1978; Sargeant y Williams, 1979), la captura de antígenos de superficie con anticuerpos monoclonales a partir de heces (Petri y col., 1990), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Freitas y col., 2004), secuenciamiento del RNAr (Clark y Diamond, 1991) y el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Tannich y Burchard, 1991).

Basándose en todo lo anteriormente expuesto, las recomendaciones del grupo de expertos sobre amibiasis, OMS/OPS reunidos en abril de 1997, fueron que se identifique específicamente la *E. histolytica* y si está presente, tratarla, mientras que si sólo se identifica *E. dispar* no será necesario un tratamiento. Si la persona infectada por esta especie tiene síntomas gastrointestinales, se deberán buscar otras causas. No será indicado el tratamiento en los individuos asintomáticos en quienes se les reporta *E. histolytica/E.dispar* y sin una identificación específica de *E. histolytica*, a menos que hayan razones para sospechar una infección por esta última, tales como títulos altos de anticuerpos, historia de contacto estrecho con casos de amibiasis invasora o un brote epidémico (OMS, 1997).

A pesar de todos los estudios realizados y de existir una terapia efectiva contra esta enfermedad, la morbilidad y mortalidad asociada a la infección amibiana ha persistido, lo que ha hecho que los especialistas del tema dirijan sus investigaciones al desarrollo de nuevas estrategias que permitan reducir o eliminar esta enfermedad. Sin embargo, la no existencia de una vacuna apropiada que permita prevenir la trasmisión del parásito o al menos la progresión a la enfermedad invasiva en los individuos infectados ha constituido el mayor problema para el control de la amibiasis, por lo que en la actualidad se están identificando y estudiando proteínas amibianas que sean capaces de prevenir la amibiasis intestinal o prevenir la formación de abscesos hepáticos, como candidatas para el desarrollo de vacunas. Aunque la mayoría de los resultados han sido obtenidos en roedores experimentalmente infectados, falta mucho por hacer para reproducir estos resultados en humanos (Petri y Ravdin, 1991; Zhang y col., 1994; Soong y col., 1995).

1.2 Clasificación taxonómica y filogenia.

Entamoeba histolytica es un parásito protozooario evolutivamente muy primitivo, considerado como un prototipo de célula eucarionte. Taxonomicamente, se le clasifica de la siguiente manera (Zaman-Vigar, 1979; Smirnov y col., 2005).

IMPERIO O SUPER-REINO Eukariota

REINO Protista

PHYLUM Amoebozoa

SUBPHYLUM Sarcodina

SUPERCLASE Rhizopoda

CLASE Labosea

ORDEN *Amoebida*

FAMILIA *Entamoebidae*

GENERO *Entamoeba*

ESPECIE *Entamoeba histolytica*

La sistemática de los eucariontes ameboides sigue en constante estudio. No existen características fenotípicas que una al grupo, más que la forma de locomoción (Hinkle y col., 1994; Silberman, Clark, y Sogin, 1996). La noción de que las morfologías eucarióticas primitivas eran parecidas a células ameboides (Meza, 1992; Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993) no está soportada por los datos moleculares.

Basándose en la ausencia de mitocondrias y otros organelos eucarióticos (Martínez-Palomo, 1986), Bakker-Grunwald y Wöstmann (1993) argumentaron que *Entamoeba* era un modelo apropiado de los eucariontes primitivos. Estudios de filogenia molecular inferidos de la comparación de alfa, beta y gamma tubulina (Hasegawa y col., 1993; Edlind y col., 1996; Keeling, Poulsen y McFadden 1998) le dan una ubicación filogenética basal a *Entamoeba*. En contraste, los estudios filogenéticos basándose en la subunidad pequeña de DNA ribosomal (rDNA) (Sogin and Silberman, 1998)

y factores de alargamiento (Shirakura et al., 1994; Baldauf, Palmer, and Doolittle, 1996) muestran que la divergencia de *Entamoeba sp.* es relativamente posterior a la antes mencionada. Esto hace pensar que si *Entamoeba sp.* no representa un linaje de divergencia temprana, su falta de mitocondria se debe a una pérdida secundaria en lugar de ser un estado primitivo. El soporte de esta última hipótesis proviene de los estudios que revelan la presencia de genes en *E. histolytica*, que codifican proteínas normalmente asociadas con mitocondrias (Clark y Roger, 1995). La detección de un compartimiento subcelular derivado de un mitocondrion en *E. histolytica* (Mai y col., 1999; Tovar, Fischer y Clark, 1999) también confirma la hipótesis de la pérdida de la mitocondria como proceso secundario en el linaje ameboide. Sin embargo, se requieren de más estudios para conocer la posición evolutiva correcta de *Entamoeba sp.* en la filogenia eucariótica.

1.3 Epidemiología

La amibiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante del mundo. Tiene una distribución mundial que varía de un lugar a otro. Generalmente las tasas de prevalencia son más altas en algunas zonas del trópico, donde el saneamiento es deficiente (WHO, 1997; Haque y col., 2003). Se calcula en 500 millones el número de personas infectadas con este parásito en el mundo, de éstas sólo el 10% desarrollan la enfermedad, llegando a ser letal en el 0.1% de estos últimos (Walsh, 1986).

Se ha estimado que *E. histolytica* es responsable de 40 a 50 millones de casos anuales de amibiasis invasiva (colitis y abscesos hepáticos), fundamentalmente en países tropicales y subtropicales (Walsh, 1986), afectando fundamentalmente a pobladores de áreas remotas con pobres condiciones higiénico-sanitarias. Aunque este parásito tiene una distribución mundial y ha sido encontrado en todos los climas, incluyendo las regiones subpolares (Salata y Ravdin, 1988); se han reportado varios países de escaso desarrollo con una prevalencia superior al 10% (Haque y col., 1997; Blessmann y col., 2002; Stanley, 2003; Haque y col., 2003). Estos países no pueden realizar un saneamiento efectivo que prevenga la transmisión fecal-oral y por lo tanto enfrentan un pobre control de la enfermedad. Se considera a la India, sur y oeste de África, Lejano Oriente y sur y centro América, las áreas con mayor incidencia (Ravdin, 1995). En Hue (Vietnam) una ciudad de aproximadamente 1 millón de habitantes se reportaron 1500 casos de abscesos hepáticos en un período de cinco años (Pham y col., 1996), existiendo una incidencia de abscesos hepáticos amibianos de 21 por cada 100 000 habitantes (Blessmann y col., 2002). Mientras que en Egipto, donde la amibiasis tiende a presentarse en forma de colitis amibiana, un sondeo realizado en el 2002 reportó que el 38% de los pacientes con diarrea presentaban colitis amibiana (Abd-Alla MD y Ravdin JI, 2002). En Bangladesh, un seguimiento realizado en niños por un período de dos años, mostró que el 55% desarrolló una infección con *E. histolytica*, de los cuales el 20% desarrolló diarrea y el 8% presentó colitis

amibiana, mientras que el resto cursó una infección asintomática (Haque y col., 2002).

En México, la amibiasis sigue representando un grave problema de salud pública nacional, en 1996 se reportaron 1.3 millones de casos de amibiasis intestinal y aunque no se diferencia entre *E. histolytica* y *E. dispar*, los datos son consistentes con estudios serológicos que indican que más del 8% de la población mexicana ha tenido al menos un episodio de amibiasis (PAHO, 1998; Caballero-Salcedo y col., 1994). Estudios realizados en el período de 1986-1994, arrojaron como resultado que esta enfermedad se presenta durante todo el año, aumentando la incidencia durante la primavera y el verano (Trevino García-Manzo y col., 1994). Se reportó una incidencia nacional promedio de 1 000 a 1 200 casos en todas las manifestaciones clínicas de la amibiasis por cada 100 000 habitantes a nivel nacional (Escandón y col., 1996). Los casos de amibiasis hepática han disminuido considerablemente a partir de 1990, reportándose tasas de morbilidad entre tres y cuatro casos por cada 100 000 habitantes (Trevino García-Manzo y col., 1994; Escandón y col., 1996). En el año 1998, el número de casos de absceso hepático amibiano se estimó en 6.77 casos por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, estudios posteriores mostraron una incidencia relativamente alta en la zona fronteriza de Chiapas con Guatemala (51.2) (Morales-Espinoza y col., 2003).

Muchos de los estudios realizados sobre la prevalencia de la amibiasis están limitados por la falta de diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*.

Es por ello que la diferenciación de estas dos especies mediante caracterización molecular en los últimos años (Diamond y Clark, 1993), condujo a la necesidad de volver a evaluar la epidemiología de la amibiasis en términos de prevalencia y morbilidad de esta parasitosis a nivel mundial, particularmente en aquellas regiones geográficas donde es endémica. México y otros países latinoamericanos han hecho esfuerzos para estudiar la epidemiología de esta infección utilizando herramientas de Biología Molecular (Romero y col., 1992; Acuña-Soto y col., 1993; Pineiro y col., 2005).

Se ha demostrado que las infecciones parasitarias intestinales producidas por protozoos y helmintos se encuentran entre las 20 principales causas de enfermedades en México, y la amibiasis con sus diferentes manifestaciones clínicas se ubica entre las cinco primeras (Secretaría de Salud, 2003). Estudios recientes realizados por el grupo de la Dra. Cecilia Ximénez, empleando estas herramientas moleculares, han mostrado que en una comunidad rural del estado de Morelos con una población de 903 habitantes, la prevalencia detectada mediante microscopía fue de 12.8% para *E. histolytica*/*E. dispar*, sin embargo por PCR en esta misma comunidad la prevalencia fue de 13.8% para *E. histolytica* y de 9.7% para *E. dispar* (Ramos y col., 2005). Lo que refleja la importancia de realizar estudios longitudinales en diferentes áreas endémicas con las herramientas moleculares para generar datos más fidedignos de la infección con *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

El reto de la epidemiología molecular de la amibiasis en México, está enfocado a la obtención de nuevos datos que ayuden a comprender la verdadera magnitud de esta enfermedad y evaluar el costo-beneficio de la implementación de medidas específicas de control en poblaciones de riesgo (Ximénez, 2006).

1.4 Morfología

Se pueden distinguir tres formas o fases de desarrollo en esta especie (prequiste, quiste y trofozoito), las que se encuentran presentes durante varias etapas de su ciclo de vida. Sin embargo, cabe señalar que no se aprecian diferencias entre *E. histolytica* y *E. dispar*, durante el análisis microscópico (Bernal-Redondo, 2001).

El prequiste

Es la forma intermedia entre el trofozoito y el quiste. Es redondeado sin membrana quística y contiene 1 núcleo, vacuolas llenas de glicógeno y barras cromidiales que se caracterizan por tener sus extremos gruesos (Martínez-Palomo, 1987).

Quiste

Los quistes amibianos tienen forma redondeada o ligeramente ovalada, de 8 a 20 μm de diámetro. Su citoplasma incoloro permite la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y nucleolos en número de uno a cuatro (Martínez-Palomo, 1987). El quiste es la forma infectiva de *E. histolytica*. El

quiste maduro posee cuatro núcleos con un cariosoma central que son morfológicamente similares a los del trofozoito. Tiene una pared de 125-150 nm de grosor formada de quitina, que le proporciona resistencia a los cambios de temperatura, humedad y presión osmótica (Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo, 1982). Los mecanismos de enquistamiento y muchas de las propiedades de los quistes aún continúan bajo estudio, debido a la imposibilidad de su cultivo en el laboratorio.

Trofozoito

Es la forma invasiva de la especie. Se caracteriza por tener un núcleo con una concentración de cromatina puntiforme y generalmente concéntrica llamado cariosoma central; así como la formación de cromatina en la periferia del núcleo (Gillin y Diamond, 1980). Es pleomórfico, de 10-40 μm de diámetro, con mucha motilidad y un anaerobio facultativo. Su movilidad se puede ver afectada por cambios bruscos de temperatura, del pH, la osmolaridad y el potencial redox (Gillin y Diamond, 1980). Su citoplasma carece de algunos organelos presentes en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistemas lisosomales primarios y secundarios (Arhets y col., 1995). Se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (Arhets y col., 1995). Tiene un núcleo organizado y genoma complejo y superficie formada por una sola membrana plasmática (Arhets y col., 1995). El trofozoito puede extender pseudópodos desde diferentes partes de

la célula y frecuentemente se observa un uroide en su parte posterior conformado por miosina II y proteínas de la membrana plasmática del parásito (Arhets y col., 1995). Cuando se realizan cultivos monoaxénicos o se ponen en contacto con tejido epitelial, se pueden observar filopodios (Martínez-Palomo, 1987). Presentan vesículas micropinocíticas observables mediante microscopía electrónica de barrido (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

1.5 Ciclo de vida

La infección se inicia cuando se consumen alimentos o agua contaminada con quistes amibianos (Feachem, 1983). Estos recorren el tracto digestivo y al llegar a la región íleon-secal se desenquistan, produciendo un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los núcleos sufre una división y el protoplasto da lugar a ocho trofozoítos metaquísticos de un sólo núcleo (Lushbaugh y Miller, 1988). Así, el ciclo de vida del parásito es por lo tanto relativamente simple, con una forma quística infecciosa y una de trofozoíto invasivo.

Los trofozoítos producidos a este nivel intestinal logran reproducirse por fisión binaria y finalmente pueden (Orozco y col., 2000) (Figura1): 1) Ser expulsados con las heces para morir inmediatamente por su escasa

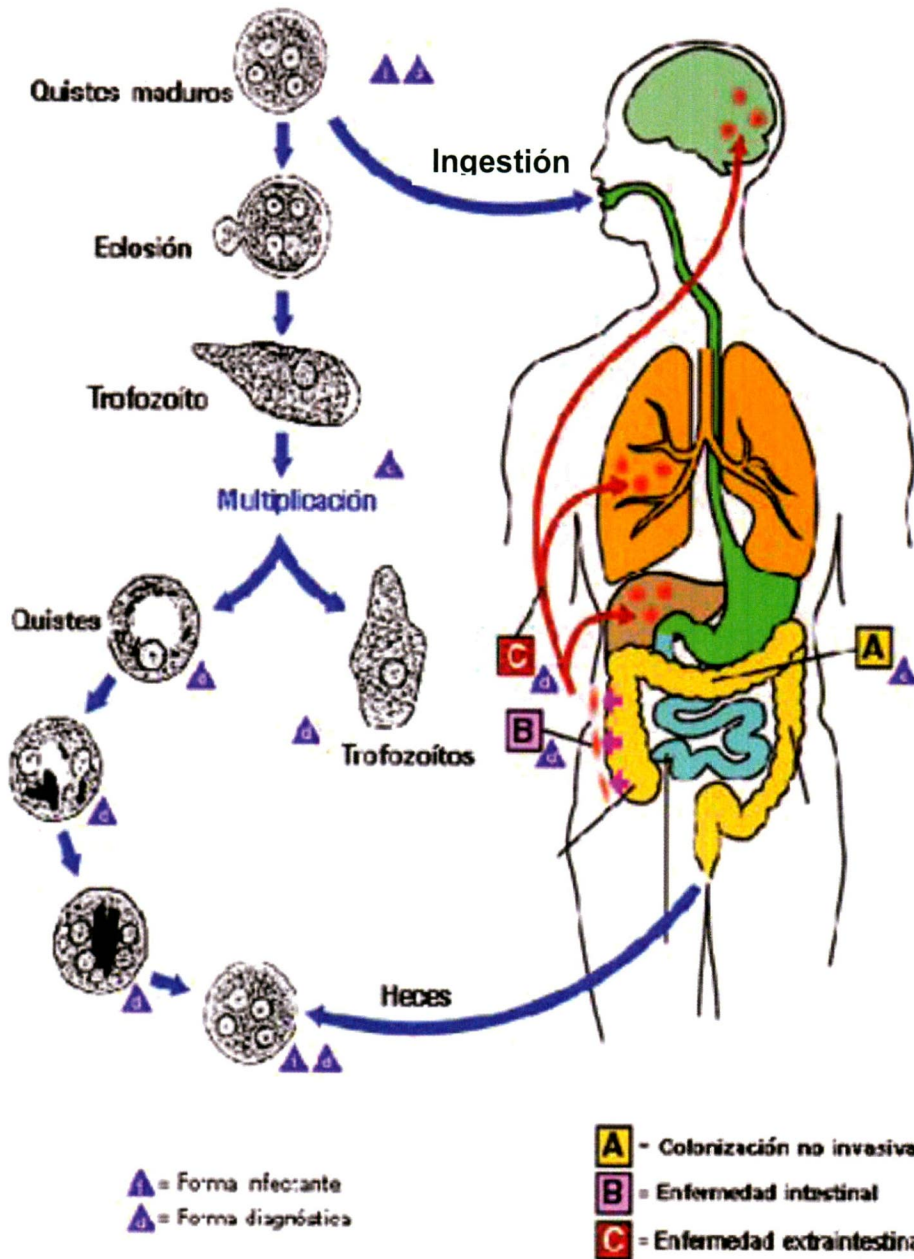


Figura 1. **Ciclo de vida de *E. histolytica***

Los quistes maduros contaminan el agua y los alimentos constituyendo la forma infeccante. Al ser ingeridos por el humano, se desenquistan para dar origen a los trofozoitos que son la forma invasiva. Los trofozoitos se multiplican a nivel intestinal pudiendo colonizar la mucosa intestinal de manera asintomática o atravesar la mucosa intestinal para invadir otros órganos o enquistarse y ser expulsados con las heces.

Modificado de <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/e-histol-life.gif>.

resistencia a las condiciones ambientales. 2) Vivir como comensales en el tracto intestinal de manera indefinida. 3) Degradar la capa de mucus e invadir la mucosa intestinal provocando desde síntomas leves hasta una disentería grave. 4) Invadir a otros órganos fundamentalmente a través del torrente sanguíneo. 5) Enquistarse y salir al medio ambiente, donde contaminan alimentos y aguas, los cuales pueden ser ingeridos por otros individuos en áreas con bajos niveles sanitarios y comenzar un nuevo ciclo (Feachem, 1983 y Schuster y Visvesvara, 2004).

1.6 Organización genómica.

En *E. histolytica* la división nuclear se lleva a cabo sin degradación de la membrana, por lo que la condensación de los cromosomas no es evidente (Meza y col., 1990). Se desconoce el número exacto de cromosomas presente en este parásito. La cromatina con DNA involucrado en la síntesis del RNAr se distribuye de forma periférica a lo largo del borde interno del núcleo, mientras que el DNA que interviene en la síntesis de RNAm se condensa en un endosoma central semejante a un nucleolo (Albach, 1989). El genoma contiene 9938 genes con un promedio de 1.17 kb. Se ha predicho que un cuarto de los genes de *E. histolytica* contienen intrones y el 6% de estos genes contienen múltiples intrones. El 38% de las proteínas predichas no poseen homólogos identificables a partir de bases de datos públicas (Loftus y col., 2005).

Las regiones intergénicas, así como las secuencias 5' y 3' no traducibles de los RNAm son relativamente cortas en comparación con el genoma de los eucariontes superiores (Bruchhaus y col., 1993). De forma similar, las secuencias reguladoras del comienzo y término de la transcripción, como la secuencia de la caja TATA (localizada frecuentemente 30 bp antes del ATG de inicio de la traducción) difieren de las secuencias consenso de los genes eucarióticos (Bruchhaus y col., 1993).

1.7 Patogenia

El mecanismo patogénico de la amiba es un proceso complejo y multifactorial aún no comprendido en su totalidad. A pesar de esto, existe consenso entre los estudiosos del tema en que al menos tres eventos son imprescindibles para la colonización del epitelio intestinal (Petri y Ravdin, 1988):

1. La adhesión de los trofozoitos a la célula blanco.
2. El efecto citopático dependiente del contacto.
3. La fagocitosis.

En cada evento participan varias moléculas con funciones bien definidas, lo que no excluye la participación de una misma molécula en más de uno de estos eventos. Ya han sido caracterizadas bioquímica e inmunológicamente algunas proteínas con funciones claves en estos mecanismos de agresión del parásito (Ravdin y Guerrant, 1981; García Rivera y col, 1999).

De acuerdo con el cúmulo de resultados experimentales obtenidos por diferentes grupos de investigación a nivel mundial, se propuso un modelo para explicar la penetración de la mucosa colónica por parte de *E. histolytica*, que conduce a la invasión, destrucción tisular y persistencia del parásito (Huston, 2004). Según este modelo, la adherencia de los trofozoitos amibianos a la mucosa colónica constituye el evento inicial y clave, siendo altamente dependiente de la interacción entre adhesinas de la superficie amibiana con glicoconjugados del hospedero. Se han descrito y caracterizado varias moléculas involucradas en el proceso, entre las que se encuentran la lectina inhibible por D-galactosa/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) (Petri, 1987; Chadee, 1987), la lectina de 220 kDa (Rosales Encina y col,1987), la lectina de 150 kDa que copurifica con la Gal/GalNAc (Cheng y col,1998; Cheng, 2001), la proteína rica en serina (SREHP) (Stanley y col, 1990), la proteína de 66 kDa (Vohra y col., 1992) y la proteína de superficie de 112 kDa (García-Rivera, 1999).

En los individuos que desarrollan la forma invasiva de la amibiasis, la adherencia está seguida por la penetración del trofozoito a la barrera de mucus del colon y el contacto directo con el epitelio. Se ha reportado que después del contacto hay secreción de amebaporos, un polipéptido de 5 kDa con capacidad de formar poros en la membrana y facilita la lisis de la célula hospedera (Leippe, 1991), ya que es capaz de matar a las células eucarióticas y manifiesta actividad bactericida (Leippe y Muller-Eberhard, 1994). El trofozoito secreta además una familia de cistein-proteasas que

escinden la polimerización de mucinas (MUC2), la componente mayoritaria del mucus del colon humano, facilitando la adhesión de los trofozoitos a las células del hospedero (Moncada, 2003). Se han identificado 50 genes de cistein-proteasas en *E. histolytica* (Tillack y col., 2007), y se ha visto una correlación entre la expresión de este tipo de proteasas con la patogenicidad de este parásito (Bruchhaus y col, 2003). También se ha observado que los cultivos de aislamientos clínicos de *E. histolytica* producen de 10-100 veces más cistein-proteasas que los de *E. dispar* (Reed y col, 1989). Se ha reportado además que *E. dispar* no posee dos de estos genes (*Ehcp1* y *Ehcp5*) (Buchhaus y col, 2003). Experimentos *in vitro* han mostrado que estas proteasas degradan proteínas importantes de la matriz extracelular que incluyen colágeno tipo I, fibronectina y laminina (Keene, 1986; Li, 1995) y facilitan la penetración tisular (Que y Reed, 2000). Las células del epitelio intestinal son capaces de censar la infección e iniciar una respuesta inmunológica, promoviendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias y factores solubles (Jung y col., 1995). Las células del epitelio intestinal poseen receptores específicos denominados receptores similares a Toll (Toll like receptors), los cuales detectan la presencia de patógenos (Cario y Podolsky, 2000). En el caso de la invasión amibiana se ha especulado sobre posibles moléculas blanco reconocidas por estos receptores, entre las que se encuentran la lectina de 260 kDa, ya que su subunidad pesada se encuentra oculta en la superficie de *E. dispar* y expuesta en la de *E. histolytica* (Pillai y col., 2001), pudiendo constituir un

blanco para discriminar entre amibas patógenas y no patógenas. De manera similar se habla del lipofosfoglicano que recubre a los trofozoitos, presente 10% menos en *E. dispar* que en *E. histolytica* (Moody y col., 1998; Bhattacharya y col., 2000) y de la cistein proteasa 5, que no es expresada en *E. dispar* (Bruchhaus y col., 1996; Willhoeft y col., 1999).

In vivo se ha observado que la destrucción del epitelio del colon es producida tanto por el contacto directo de la amiba con las células epiteliales, como de la inducción de una potente respuesta inflamatoria producida por las células epiteliales con el reclutamiento de neutrófilos y daño del tejido (Seydel y col., 1998). La penetración profunda del tejido, seguido por una extensión lateral de la lesión produce las ulceraciones “en forma de frasco” característica de la enfermedad bien desarrollada y la posibilidad de una diseminación a tejidos extraintestinales (fundamentalmente al hígado, a donde se piensa que llega el parásito por vía sanguínea, pero esto no ha sido probado) (Huston, 2004).

El mecanismo de destrucción celular ha sido muy investigado y sigue bajo discusión, pero se conoce que se requiere el contacto directo del trofozoito con la célula del hospedero (Li y col., 1989; Ravdin, 1989). Las células epiteliales lisadas liberan pre-IL-1, la cual es procesada a su forma activa por las cistein-proteasas amibianas, atribuyéndosele un papel directo en el desarrollo de la inflamación presente en estadios tempranos de la invasión del colon (Zhang y col., 2000) y contribuyendo a potenciar el daño por la producción de otros mediadores inflamatorios adyacentes a la célula lisada,

entre los que se incluyen IL-8, IL-6, GM-CSF, ciclooxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible y TNF- α (Jung y col., 1995). Este parásito puede tomar ventaja del estímulo inflamatorio e incrementar su unión al epitelio del colon y diseminarse a otros órganos (Flores-Romo y col., 1993). Además, se cuenta con datos experimentales que sugieren que la inmunidad adquirida puede perpetuar la inflamación y el daño tisular (Haupt y col., 2002). Las células CD4+ pueden mediar directamente la inflamación bajo ciertas circunstancias, también es posible que estas células sean contraproducentes mediante una regulación negativa sobre las funciones protectoras del macrófago.

Una vez iniciado el proceso inflamatorio, los trofozoitos tienen que luchar contra los intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) como el óxido nítrico (NO) producido por las células del epitelio intestinal activadas y contra las moléculas citotóxicas, los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y del nitrógeno producidos por los neutrófilos. *E. histolytica* produce una superóxido dismutasa que contiene hierro y que le permite convertir los aniones superóxidos en peróxido de hidrógeno (Bruchhaus y Tannich, 1994). Los hidroperóxidos producidos durante el estrés oxidativo pueden ser detoxificados por la flavina, una oxidoreductasa bifuncional, que contiene actividades disulfuro reductasa y actividad formadora de peróxido de hidrógeno, ambas dependientes de NADPH (Bruchhaus y col., 1998).

Se conoce que *E. histolytica* presenta en su superficie un antígeno de 29 kDa rico en cisternas, que se piensa participa en la detoxificación de

especies reactivas del oxígeno endógenas (Bruchhaus y col., 1997; Flores-Romo y col., 1993).

También es poco conocido el mecanismo mediante el cual *E. histolytica* puede resistir los intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI). Existen trabajos que demuestran que las proteínas amibianas inhiben la síntesis de NO en los macrófagos murinos derivados de médula ósea (Wang y col., 1994). Se ha identificado un péptido amibiano que inhibe la producción de NO en los monocitos y neutrófilos (Rico y col., 2000). El NO es producido enzimáticamente a partir de la L-arginina bajo la acción de la NO sintasa y se conoce que *E. histolytica*, consume arginina durante su crecimiento en medio TYI-S-33 (Zou y Coombs, 1995), pudiendo ser este un mecanismo de inhibición de la síntesis de NO. En los extractos crudos de *E. histolytica* se ha detectado actividad arginasa (Corraliza y col., 1994) y se ha identificado y clonado un gen homólogo al de la L-arginasa de *E. coli* (Ankri, 2002). Se ha identificado actividad de peroxiredoxina en este parásito, la cual puede estar asociada a la detoxificación de peroxinitritos, sin embargo esto no ha sido confirmado.

También se han caracterizado proteínas, de la familia de estrés térmico (HSP70 y HSP100), las que pudieran contribuir a la resistencia del parásito frente a RNI (Bakatselou y col., 2000).

En cuanto a la resistencia a las moléculas citotóxicas liberadas por los neutrófilos, se conoce que los granulos azurofilos de los neutrófilos humanos contienen una familia de proteínas con homología estructural a

las serina proteinasas (captetina G, elastasa y proteinasa-3) (Borregaard y col., 1993) y que la actividad de estas proteinasas es naturalmente regulada por miembros de la superfamilia de inhibidores de serina proteinasas (serpinas) (Ye y Goldsmith, 2001). En el genoma de *E. histolytica*, se ha identificado un gen con gran homología a los miembros de la familia de las serpinas (Ehserp), que son inhibidores de serinas proteazas. Esta proteína citoplasmática se ha observado que sólo se secreta por activación de los trofozoitos amibianos con células de mamíferos y por una vía que depende de lectinas (Ankri, 2002). Ehserp inhibe la captetina G de los neutrófilos, lo que pudiera constituir un mecanismo de evasión frente a la respuesta del sistema inmune del hospedero (Tani y col., 2001; Ankri, 2002).

E. histolytica tiene la capacidad de evadir por diferentes vías la respuesta inmune durante la infección crónica. La lectina Gal/GalNAc tiene similitudes secuenciales y reactividad cruzada con el CD59, lo que evita el ensamblaje del complejo C5b-9 del sistema del complemento (Braga y col., 1992). Las moléculas de glicosilfosfatidilinositol y lipofosfoglicanos que recubren a los trofozoitos también los protegen contra el ataque del complemento. Algunas cistein-proteasas amibianas degradan eficientemente las anafilotoxinas del complemento C3a y C5a, IgA secretoria e IgG sérica, así como pre-IL-18 (Reed, 1995; Que y col., 2003). Los macrófagos pueden ser importantes para lograr una respuesta inmune efectiva, porque adquieren la habilidad de aniquilar a las amibas virulentas

cuando son activadas con INF- γ , sin embargo, *in vivo*, *E. histolytica* suprime la activación y la presentación por MHC-II del macrófago (Wang y Chadee, 1995).

1.8 Manifestaciones clínicas

De acuerdo a los síntomas y signos presentados los individuos infectados, la amibiasis puede ser clasificada como: asintomática, sintomática sin evidencia de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular (Ortiz-Ortiz, 1994).

La amibiasis asintomática es cuando el individuo presenta quistes de *E. histolytica* pero no manifestaciones clínicas. El hallazgo de quistes del protozooario puede ser fortuito, pudiendo mantener este estado de portador hasta por dos años; siendo de gran importancia debido a que estos sujetos constituyen una fuente de diseminación de la infección, sobre todo si manejan alimentos y no guardan las normas de higiene adecuadas (Ortiz-Ortiz, 1994).

La amibiasis sintomática se presenta generalmente como una enfermedad intestinal. Esta enfermedad se asocia con una amplia gama de alteraciones anatómicas, que corresponden a condiciones clínicas bien definidas y se presenta en los seres humanos de cualquier edad, aunque se ha observado con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes. Se manifiesta de diferentes formas produciendo: disentería aguda fulminante con fiebres y escalofríos, flatulencia, dolor de cabeza y fatiga o diarrea sanguinolenta

mucoide (llamada disentería amibiana); pudiendo llegar a causar un malestar abdominal leve, que se alterna con períodos de estreñimiento; e incluso puede provocar la muerte. Según las manifestaciones clínicas de los pacientes se ha podido establecer cuatro formas fundamentales: La diarreica-disentérica, la colitis fulminante, la apendicitis y el ameboma (Pérez-Tamayo, 1986).

La forma clínica diarreico-disentérico, se caracteriza por un cuadro clínico como el anteriormente descrito, es la forma más común ya que representa el 90% de la amibiasis invasora y generalmente tiene una duración menor a la semana. Se presenta con evacuaciones sanguinolentas, con dolor cólico moderado que precede a la evacuación, la cual está formada por materia fecal escasa, líquida, teñida con sangre, generalmente no hay fiebre pero en lactantes se puede presentar con fiebre y sin sangre microscópica en las evacuaciones. Los pacientes desnutridos cursan esta enfermedad con fiebre, prolapso rectal e infección agregada; teniendo una letalidad del 0.5% (Pumarola y col., 1991).

La colitis fulminante se presenta principalmente en lactantes y niños menores de tres años con desnutrición avanzada. El cuadro clínico se da con manifestaciones de peritonitis por el estado tóxico-infeccioso y por perforaciones. Los pacientes presentan úlceras necróticas que afectan grandes áreas del colon y lesionan todas las capas de la pared colónica. Se manifiesta con más de 20 evacuaciones diarias formadas por material fecal

y sangre y precedidas por dolor cólico intenso, tenesmo constante y malestar abdominal, pudiendo acompañarse de náuseas, anorexia, fiebre de 39-40 °C, hipotensión arterial, ausencia de peristalsis y estado de choque. Presenta una letalidad del 50 al 80% (Pumarola y col., 1991).

La apendicitis amibiana no se puede diferenciar de otros tipos de apendicitis por medios clínicos. Se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes (Pumarola y col., 1991).

El ameboma es una presentación inusual de la amibiasis intestinal que ocurre en menos del 1% de los pacientes con enfermedad invasora intestinal. Se presenta como una forma segmentaria rara de colitis amibiana crónica, es más común en el ciego y en el colon ascendente, presentando una masa abdominal sensible que puede confundirse con un carcinoma de colon. El organismo reacciona de forma exagerada contra la ameba y forma tejido de granulación que da lugar a zonas de estrechez, como un pequeño tumor. Es raro en niños y se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes. Está caracterizado por diarrea mucosas-sanguinolenta (Pumarola y col., 1991).

La infección puede también diseminarse por medio de la sangre, a través de la vena portal, al hígado y con menor frecuencia a los pulmones, el cerebro o a otros órganos (Pumarola y col., 1991).

De la amibiasis extraintestinal, la localización más frecuente es la hepática, cuya incidencia es menor en las edades pediátricas que en el adulto, aunque es de mayor gravedad en infantes. El absceso hepático amibiano inicia con un cuadro brusco de dolor en la parte superior del abdomen, acentuado y persistente que se irradia a la región escapular o al hombro derecho, se presenta además hepatomegalia y fiebre (Hughes y Petri, 2000). El cuadro clínico se acentúa con la tos, con la respiración profunda o cuando el paciente está acostado sobre el lado derecho. Cuando el absceso se localiza en el lóbulo izquierdo, el dolor se percibe sobre todo en el epigastrio (Hughes y Petri, 2000). La fiebre varía entre 38 a 40°C y con frecuencia tiene un patrón en agujas. En la exploración física se encuentra un paciente pálido, emaciado, con hepatomegalia dolorosa. La digito presión intercostal y la puño percusión del área hepática son dolorosas. Es frecuente encontrar disminuido el murmullo vesicular en la base pulmonar derecha, debido a reacción pleuropulmonar por contigüidad sobre todo cuando el absceso se encuentra en la parte alta del lóbulo derecho. La movilidad del hemidiafragma derecho está restringida. En ocasiones el absceso hepático puede sufrir complicaciones del tipo del drenaje a cavidades vecinas (abdominal, pleural y pericárdica), lo que hace que el pronóstico sea más sombrío. Se presenta con mayor frecuencia en el sexo masculino y se localiza preferencialmente en el lóbulo derecho. Puede producir ruptura de la cavidad pleural, del peritoneo, el pericardio o diseminarse a piel y cerebro (Hughes y Petri, 2000).

Los factores de riesgo para la amibiasis severa abarcan: desnutrición, edad avanzada, embarazo, uso de esteroides, una malignidad (cáncer) y alcoholismo, al igual que un viaje reciente a una región de alta incidencia (Sepúlveda, 1982).

1.9. Respuesta inmune frente a *E. histolytica*.

1.9.1 Respuesta inmune innata

Las enzimas digestivas, la flora bacteriana y la capa de moco forman una barrera que protege la integridad del epitelio de la mucosa. Hay evidencias que sugieren que las mucinas del colon constituyen la principal defensa del huésped contra la invasión de los trofozoítos de *E. histolytica*. En modelos experimentales de amibiasis intestinal, la eliminación de la capa de moco precedió a la invasión parasitaria (Chadee y Meerovitch, 1985)

En estudios posteriores se describió que células de la línea HT-29, de epitelio del colon co-cultivadas con *E.coli* DH5- α y con trofozoítos de *E. histolytica*, mostraron un incremento en la expresión de IL-8, IL-1 α , GM-CSF, con respecto a las cultivadas en ausencia de bacterias, lo que sugiere la participación de las bacterias entéricas en las señales proinflamatorias tempranas del huésped frente a la infección amibiana (Kim y col., 1998).

Neutrófilos polimorfo-nucleares

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que *E. histolytica* emite señales de quimioatracción para neutrófilos polimorfo-nucleares (PMN) humanos. Se ha visto que estas células del sistema inmune son capaces de matar

trofozoitos no patógenos (Guerrant y col., 1981). Está reportado que los PMN fragmentan e ingieren amibas por un mecanismo desconocido, independiente de oxígeno y complemento. En contraste, al entrar en contacto con amibas virulentas los PMN pierden su motilidad, se degranulan y mueren, aunque los que permanecen en la vecindad de las amibas sobreviven (Chadee y Meerovitch, 1984).

Modelos de absceso hepático en jerbos, permitieron concluir que los neutrófilos representan la respuesta inicial del hospedero a la invasión del hígado, pero que ésta es ineficiente para matar al parásito (Chadee y Meerovitch, 1984). Estudios *in vivo* e *in vitro*, sugieren que la lisis subsecuente del neutrófilo por las amibas permiten la liberación de productos no oxidativos que contribuyen a la destrucción de tejido del huésped y a la patogénesis de la amiba (Salata y Ravdin, 1986).

Al analizar las lesiones amibianas inducidas en el hígado de ratones BALB/c normales y con depleción de neutrófilos, se observó que los daños fueron considerablemente mayores en el grupo de animales a los que se les eliminó los neutrófilos. Esto sugirió un papel importante de los neutrófilos en la limitación de la extensión de las lesiones hepáticas causadas por amibas (Velázquez, 1998). Existen evidencias de que los neutrófilos activados con IFN- γ o TNF- α en presencia de lipopolisacáridos (LPS) o antígenos amibianos, presentan un comportamiento amebicida (Denis y Chadee, 1989; Guerrant y col., 1981). Estudios *in vitro* (Lin y col., 1994) e *in vivo* (Seydel y col., 2000) han demostrado la importancia del óxido nítrico

(NO) como molécula efectora de la actividad amibicida en neutrófilos y macrófagos.

Complemento

El complemento es otro de los componentes del sistema inmune que participa en la respuesta del hospedero ante la invasión amibiana. La depleción de los niveles de complemento en hámsteres a los que se les inocularon amibas patógenas llevó a lesiones hepáticas más severas y extensas que las que se produjeron en los animales, con niveles normales (Calderón, 1988). Estos resultados sugieren una participación *in vivo* de la vía alterna del complemento en la defensa del huésped contra la amiba.

La activación de la vía alterna del complemento, permite lisar cepas de *E. dispar* pero no cepas patógenas de *E. histolytica* (Reed y col., 1989). Además, en el contenido intestinal se reporta una actividad anti-complemento (Befus y Bienenstock, 1982).

Si bien las cepas virulentas son generalmente resistentes a la lisis durante la incubación con suero humano fresco y las no virulentas sensibles, no existen diferencias significativas en la activación del complemento entre ambas cepas (Gutiérrez-Kobh y col., 1997). Por otra parte, la exposición repetida al suero humano normal, de trofozoítos sensibles a la lisis por complemento, los convierte en resistentes y potencia su virulencia aumentando la capacidad de producir abscesos hepáticos en hámsteres (Gutiérrez-Kobh y col., 1997). Estos resultados sugieren que la resistencia

a la lisis por complemento es un fenómeno adquirido, más que una propiedad genética de la amiba.

De igual forma, existen evidencias de la activación por *E. histolytica* de la vía clásica del complemento. Calderon y Schreiber (1985), estudiaron la contribución relativa de cada vía a la activación del complemento de suero humano no inmune, ocasionada por trofozoítos. Utilizando inhibidores específicos, comprobaron que las dos vías participan y que es mayor la contribución de la vía clásica (Calderon y Schreiber, 1985).

Se ha reportado que la lectina inhibible por galactosa y N-acetilgalactosamina de *E. histolytica* presenta reactividad cruzada y comparte secuencias con la proteína CD59, un inhibidor importante de la formación del complejo de ataque de la membrana (CAM) del sistema de complemento. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítotope del dominio rico en cisteína de esta lectina incrementó la lisis de los trofozoítos por el CAM. La lectina purificada es capaz de unir a los componentes C8 y C9 del complejo y de conferir resistencia a amibas sensibles (Braga y col., 1992).

Por todo esto, el papel del complemento como defensa contra parásitos intestinales permanece en debate.

Macrófagos

Los macrófagos encontrados en los abscesos hepáticos amibianos son incapaces de desarrollar estallido respiratorio, matar amibas y responder a las interlucinas *in vitro* (Denis y Chadee, 1988). No obstante, los

macrófagos aislados del bazo y de la cavidad peritoneal de los mismos animales enfermos no presentan una disminución significativa de estas funciones. Extractos crudos o medio de cultivo de amibas patógenas inducen en los macrófagos un comportamiento similar al que tienen estas células en los abscesos, mientras que extractos crudos de amibas no virulentas de la cepa Laredo son incapaces de reproducirlo (Denis y Chadee, 1988). Estos resultados indican que la supresión de la actividad de los macrófagos puede estar limitada al sitio de la infección.

Exposiciones a lisados solubles de *E. histolytica* estimulan en los macrófagos derivados de médula ósea de ratones Balb/c, la expresión de los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de la interleucina 1(IL-1) alfa y beta. No así lisados de trofozoítos de la cepa Laredo (Seguin y Chadee, 1992). Ambas interleucinas tiene como principal función actuar como mediadores de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad natural. Esto sugiere una posible actividad de los macrófagos en los mecanismos tempranos de defensa frente a la amiba.

El INF γ actúa sobre los macrófagos murinos derivados de médula ósea aumentando la expresión de moléculas clase II del MHC e incrementando así la eficacia de presentación del antígeno a las células T CD4+. Proteínas totales de *E. histolytica* suprimen este efecto, estimulando la producción por los macrófagos de prostaglandina E2 (PGE2), la cual actúa de forma autocrina y es responsable en parte de la inhibición en la producción del TNF- α (Wang y Chadee, 1995). Estudios posteriores, usando el modelo de

absceso hepático en hámster, confirmaron la participación de PGE2 en la patogénesis del absceso. Empleando inhibidores de la síntesis de PGE2, se observó una reducción de las lesiones después de la infección hepática con respecto al grupo control (Sanchez-Ramírez, 1997).

Los macrófagos y polimorfonucleares de hámsteres vacunados o protegidos no son fagocitados, por el contrario, son capaces de matar a las amibas *in vivo* (Ghadirian and Meerovitch, 1982a). Animales de experimentación en los que la actividad de los macrófagos se inhibe por tratamiento con sílica, al recibir un inóculo intrahepático de trofozoítos desarrollan más abscesos y metástasis que los animales del grupo control. Además, animales tratados con el bacilo de Calmette Guérin (BCG) desarrollan abscesos significativamente menores y menor número de metástasis (Ghadirian and Meerovitch, 1982a).

Ensayos *in vitro* con la lectina nativa de 260 kDa, evidenciaron que esta es capaz de estimular la producción de INF- γ por los linfocitos T (Schain y col, 1992), y de TNF- α en los macrófagos vírgenes de ratones BALB/c, considerándose un posible mecanismo de la protección obtenida (Seguin y col, 1995).

Estudios *in vitro* demuestran que INF- γ y TNF- α son capaces de activar la capacidad citotóxica de los macrófagos contra trofozoítos de *E. histolytica*, induciendo la producción de óxido nítrico (Lin y col., 1994). La administración de un antisuero contra TNF- α , suprime la producción de TNF- α , de NO y de la actividad amebicida. Se ha demostrado además, que

el TNF- α producido por los macrófagos actúa de forma autocrina induciendo la transcripción del gen de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Lin y col., 1994).

Cultivos axénicos de trofozoítos amibianos matan *in vitro* a macrófagos no activados derivados de monocitos humanos, sin perder su viabilidad (Salata y col., 1986a). Sin embargo, macrófagos de individuos sanos, activados *in vitro*, muestran actividad amebicida (Salata y col., 1984; Salata y col., 1985), por lo que su función pudiera ser más importante en la resistencia contra las reinfecciones (Denis y Chadee, 1988).

1.9.2 Respuesta inmune específica

1.9.2.1 Respuesta inmune mucosal

El papel tradicional de los anticuerpos IgA en la defensa mucosal, se ha considerado que consiste en formar una barrera para evitar la penetración a la mucosa de las sustancias exógenas y de esa forma prevenir la infección. Estudios *in vitro* e *in vivo*, han suministrado evidencias que sugieren que la IgA puede tener papeles adicionales en la defensa mucosal. Por ejemplo, al pasar la IgA a través del revestimiento de las células epiteliales de la membrana mucosal cuando se dirige a las secreciones, tienen la oportunidad de neutralizar los patógenos intracelulares como los virus. Por otro, lado en la lámina propia tienen la oportunidad de acomplejar los antígenos y excretarlos a través del epitelio mucosal adyacente, por la misma ruta que toman las secreciones de IgA libre. Estas

últimas funciones ayudan a la recuperación de la infección (Lamm y col., 1995).

Ortiz-Ortiz y col. (1988) estudiaron la respuesta secretoria en saliva contra antígenos de membrana de *E. histolytica* mediante Western blot y encontraron que la IgA presente en la saliva de los pacientes con amibiasis intestinal estudiados reconocen los antígenos de 170, 125, 46 y 37 kDa (> 90%) mientras que menos del 10% de los sujetos sanos reconocieron a estas proteínas.

Se estudió el papel de la IgA en la eliminación de antígenos amibianos mostrándose que la IgA elimina activa y rápidamente los antígenos amibianos presentes en la circulación general (Campos y col., 1986). Se observó que los anticuerpos diméricos inducidos por *E. histolytica* producen una disminución de la posible formación de complejos con otras inmunoglobulinas que pueden producir daño tisular (Campos y col., 1986). También se ha demostrado la presencia de IgA anti-*E. histolytica* en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal, así como la capacidad de estos anticuerpos para inhibir la adhesión de la amiba a monocapas de células MDCK (Carrero y col., 1994). La saliva de estos pacientes reconoce fundamentalmente bandas proteicas de 23, 26, 30, 36, 59, 60, 87 y 170 kDa, mientras que la saliva de los sujetos sanos fue negativa a estos antígenos y ocasionalmente reconocen los antígenos de 21, 23 y 109 kDa. El 52% de las muestras de saliva de los pacientes estudiados reconocen la banda de 68 kDa mientras que el 43% de las mismas muestras reconocen

la banda de 30 kDa (Carrero y col., 1994). En este mismo estudio se demostró que la saliva de individuos infestados con otros parásitos, entre los que se incluyen *Entamoeba coli* y *G. lamblia*, no inhiben la adherencia amébrica a células MDCK (Carrero y col., 1994). Otras proteínas reportadas como reconocidas por anticuerpos IgA secretorios de la saliva de pacientes con absceso hepático amibiano son: una proteína ribosomal L23a, una ciclofilina, otra perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico Hsp70, y un péptido rico en ácido glutámico (Carrero y col., 2000). La invasión del colon por *E. histolytica* produce una respuesta IgA secretora contra la adhesina de 260 kDa, una de las proteínas que media la unión del parásito a las mucinas del colon y a las células epiteliales. Sin embargo, la amiba posee una potente actividad para degradar IgA debido a sus cistein-proteasas específicas, lo que pudiera limitar la acción de esta respuesta secretora (Ravdin y Kelsall, 1994).

En otros estudios se han detectado anticuerpos IgA contra *E. histolytica* tanto en pacientes sintomáticos como en individuos asintomáticos (Valenzuela y col., 2001; Haque y col., 2001), pero se conoce muy poco de su posible papel protector y la acción que ejerce sobre los mismos las cistein-proteasas amibianas. Por ello se estudiaron muestras de saliva humana con y sin anticuerpos contra *E. histolytica* y se encontró que el 84% de los sueros con anticuerpos contra la amiba reconocieron a una cistein-proteasa de 70 kDa (Guerrero y col., 1998). Además, la IgA purificada de un conjunto de sueros con anticuerpos contra esta proteasa,

manifestó un potente efecto inhibitor de la actividad proteolítica de *E. histolytica* en estudios *in vitro*, resultado que de ocurrir *in vivo*, podría ser un importante factor de protección (Guerrero y col., 1998).

Otros autores consideran que las cistein-proteasas son un factor de virulencia clave de la amiba, por el papel que juegan en la invasión intestinal al degradar la matriz extracelular y burlando al sistema inmune del hospedero degradando la IgA secretora, la IgG y activando el sistema del complemento (Que y col., 2003). Por lo que el estudio estructural y funcional, de estas proteasas pudiera facilitar el diseño de inhibidores específicos, los que pudieran ser utilizados como futuros agentes quimioterapeúticos (Que y Reed, 2000).

En estudios realizados en ratones se ha encontrado diferencias en el patrón isotópico de anticuerpos anti-amibianos producidos en el intestino grueso y en el delgado, lo que confirma la existencia de una compartimentación de la respuesta inmune intestinal (Moreno-Fierro y col., 2002).

Se ha encontrado que niños con anticuerpos IgA mucosales contra adhesinas amibiana fueron resistentes a la reinfección con *E. histolytica*. Sin embargo, la inmunidad fue de corta vida, y aproximadamente el 20% de los niños en el estudio tuvieron un segundo episodio de infección con *E. histolytica* (Stanley, 2001). Estos resultados indican que se puede desarrollar una inmunidad contra la amibiasis en algunos niños después de una infección intestinal, aunque esta inmunidad protectora puede ser transitoria y su importancia en la prevención de la enfermedad sigue sin

establecerse (Stanley, 2001). En otro estudio se encontró una correlación entre la respuesta IgA mucosal específica contra la lectina de 260 kDa y la protección inmune contra la amiba (Haque y col., 2001).

Lo anterior concuerda con la estrategia para prevenir enfermedades producidas por patógenos entéricos mediante una vacuna que produzca IgA secretora intestinal que bloquee la acción del patógeno (McGhee y col., 1992; Zhang y col., 1995).

1.9.2.2 Respuesta Inmune Humoral.

Los pacientes con amibiasis invasiva después de la primera o segunda semana del establecimiento de los síntomas desarrollan altos títulos de anticuerpos contra la amiba, los cuales persisten hasta por 10 años (Ravdin y col., 1988; Ravdin, 1990), aunque el papel protector de dichos anticuerpos se pone entredicho debido a que el absceso hepático amibiano sigue su curso. El suero de pacientes curados reconoce a proteínas de la superficie del trofozoito (Joyce y Ravdin, 1988) y puede, incluso, bloquear *in vitro* la adherencia de los trofozoítos a mucinas del colon (Chadee y col., 1987)

El suero inmune de pacientes con absceso hepático amibiano es capaz de proteger de forma parcial a ratones con inmunodeficiencia severa combinada. Estos ratones inmunizados pasivamente 24 horas antes del reto intrahepático, vieron reducida el área de tejido hepático dañada con respecto al grupo control, de un 24.5% a un 3.5% (Seydel y col., 1996).

Estos resultados apuntan hacia un posible papel de los anticuerpos humanos en la prevención del absceso hepático. A pesar de ello, el desarrollo de anticuerpos séricos no resulta en la resolución espontánea de la colitis invasiva o del absceso hepático en el humano (Ravdin, 1989).

E. histolytica tiene la capacidad de evadir la inmovilización por anticuerpos (Calderón y col., 1980) y la lisis mediada por la vía clásica del complemento (Ravi y col., 1980)

Se demostró que los trofozoítos poseen la capacidad de degradar las inmunoglobulinas G séricas humanas mediante la acción de la cisteína proteasa neutral, una de las primera proteínas amibianas que interactúa con el hospedero (Tran y col., 1998). Estos hallazgos pudieran explicar en parte la inefectividad de la respuesta humoral para controlar la infección por *E. histolytica*.

Ha sido reportada también la presencia de autoanticuerpos en pacientes con amibiasis hepática y en el suero de hámsteres con abscesos amibianos (Meerovitch y col., 1978). Estos hallazgos indican la existencia de un fenómeno autoinmune que puede agravar los daños provocados directamente por la amiba. Pero, anticuerpos secretados contra proteínas de superficie pueden contribuir a la resistencia de enfermedades invasivas subsecuentes, o a la colonización intestinal por el parásito (Leyva y col., 1992).

1.9.2.3 Respuesta inmune celular

Estudios en modelos animales y en la clínica han aportado evidencias del papel central que representan los mecanismos de inmunidad mediada por células en la defensa del huésped contra la amiba. Al parecer la inmunidad celular desempeña un papel protector importante en la amibiasis como sugieren las respuestas celulares obtenidas en diferentes modelos animales (Ghadirian y Meerovitch, 1981), y se comprobó que la protección por vacunación ante la infección se debía a una respuesta inmune celular (Ghadirian y col., 1980).

Debe señalarse que durante la fase aguda del absceso hepático amibiano (AHA), puede ocurrir una depresión transitoria de la respuesta inmune celular mediada por hipersensibilidad de tipo tardío hacia ciertos antígenos amibianos (Ortiz-Ortiz y col., 1975), depresión del número de linfocitos T (Archarya y Sen, 1981) y depresión en la producción del factor inhibidor de la migración (MIF) (Ortiz-Ortiz y col., 1975).

Se ha observado que los pacientes con abscesos hepáticos amibianos tienen una relación de linfocitos T CD4+/T CD8+ menor a los individuos sanos, pero una vez que se curan, los niveles de linfocitos T CD4+ se reestablecen, así como la respuesta celular contra *E. histolytica in vitro* (Salata y col., 1986a).

La participación de la inmunidad celular durante la infección amibiana ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* (Salata y col., 1986a; Schain y col., 1995; Ghost y col., 1995; Alba-Hurtado y col., 1999). Se ha observado

que animales de experimentación tratados con drogas inmunosupresoras, o que han sufrido una extirpación de sus órganos linfoides primarios y secundarios, ven reducida su resistencia a la infección amibiana (Ghadirian and Meerovitch, 1981).

Las células efectoras capaces de matar *in vitro* a trofozoítos de *E. histolytica* incluyen a linfocitos de sangre periférica, de bazo y a macrófagos peritoneales (Ghadirian and Meerovitch, 1982).

Células T de pacientes infectados presentan disminuida su respuesta proliferativa frente al estímulo de la concanavalina A y frente a los antígenos específicos (Salata y col., 1986a). Existen evidencias que demuestran que linfocitos T de pacientes curados de abscesos hepáticos amibianos presentan respuesta linfoproliferativa específica frente a los antígenos de *E. histolytica*, así como producción de linfocinas (IL-2 e INF γ) (Salata y col., 1985a) y que al menos *in vitro*, los macrófagos de estos pacientes inducen una actividad amebicida (Salata y col., 1986a; Schain y col., 1992).

Los linfocitos de pacientes, después de ser expuestos *in vitro* a proteínas amibianas, son capaces de desarrollar actividad amebicida contra trofozoítos virulentos, no así los linfocitos no expuestos o los provenientes de individuos sanos (Salata y col., 1986a). Sin embargo, no se han podido determinar los mecanismos mediante los cuales los macrófagos activados y linfocitos T previamente estimulados son resistentes frente al poder citolítico de las amibas.

Como otros parásitos, *E. histolytica* suprime transitoriamente la respuesta inmune celular del hospedero durante la fase activa de la enfermedad (Alba-Hurtado y col., 1999). Esta supresión pudiera estar mediada por factores inducidos en el suero de los pacientes, por la lectina de 260 kDa, por citotoxinas o por otros mecanismos aún no conocidos (Salata y Ravdin, 1985).

Un estudio realizado en jerbos, demostró que el suero inmune de humanos presenta un factor que disminuye en un 63% la proliferación de linfocitos frente a antígenos amibianos y reduce un 93% la producción de IFN γ con respecto al suero control (Salata y col., 1990). Se pudo concluir que esta actividad supresora no se correlaciona con el título de anticuerpos y es independiente de óxido nítrico y de prostaglandinas; sin embargo, involucra a un factor soluble que reduce la producción de IL-2 y logra una supresión transitoria de la respuesta de las células T durante la infección por *E. histolytica* (Darren y col., 1999).

Las interleucinas IL-2, IFN- γ y TNF (respuesta Th1) están involucradas en la estimulación de la actividad amebicida en macrófagos y posiblemente en el control de la enfermedad invasiva (Salata y col., 1986a; Petri y Ravdin, 1991). Una activación de la respuesta inapropiada puede exacerbar la enfermedad (Mosmann y Sad, 1996). La producción de IL-4, IL-10 y TGF- β (respuesta Th2) puede inhibir la respuesta inmune contra *E. histolytica* (Lin y Chadee, 1992). La PGE2 producida en fase temprana de la infección por amibas (Wang y Chadee, 1992), estimula la transcripción de IL-4 y reprime

la de IL-2, lo que pudiera explicar la inmunosupresión transitoria que se observa en esta fase (Lacour y col., 1994).

Durante la amibiasis hepática experimental en jerbos, en la fase inicial se observó una respuesta Th2 y coincidió con el establecimiento del daño hepático. Esta fase fue seguida por una supresión transitoria en la producción de interleucinas, en la respuesta linfoproliferativa y por un daño máximo a nivel del hígado. En la fase tardía, a los 30 y 60 días de la infección, en la que el daño en los hígados disminuía espontáneamente, así como en animales curados con metronidazol, el patrón de interleucinas encontrado fue Th1 (Campbell y Chadee, 1997). Con el objetivo de esclarecer la relación entre resistencia a la infección y secreción de interleucinas, los animales con patrón de respuesta Th1 se retaron con la inoculación intrahepática de amibas virulentas y todos resultaron resistentes (Campbell y Chadee, 1997). Los resultados sugirieron que una respuesta tipo Th1 podría contribuir a prevenir la infección; no obstante, se desconoce si estos cambios vistos en el patrón de interleucinas, en el modelo del jerbo, ocurren en el humano.

Ensayos de inmunización en jerbos con la lectina de 260 kDa han generado protección frente al reto intrahepático con amibas y se observó la liberación de IL-2 e INF- γ cuando los linfocitos del bazo proveniente de estos animales se estimularon *in vitro* con esta lectina (Schain y col., 1995; Petri y Ravdin, 1991). Por otra parte, esta proteína fue capaz de estimular la transcripción y la expresión de la IL-12 en macrófagos humanos

(Campbell y col., 2000), interleucina con un papel clave en la diferenciación hacia un patrón de respuesta Th1 porque estimula la producción de INF- γ en linfocitos T y en células asesinas naturales (Romani y col., 1997). Estudios *in vitro* muestran que el INF- γ puede inhibir en la amiba la síntesis de proteínas (medida por la incorporación de leucina tritiada) y la síntesis de DNA, en estudios realizados empleando timidina marcada. (Castellanos y col., 1989).

1.9.2.4 Generalidades de la respuesta inmune frente a *E. histolytica*.

En la actualidad sigue siendo una incógnita la respuesta inmune que es importante para conferir protección contra la amibiasis invasiva. Los modelos murinos con ratones inmunocompetentes desarrollados recientemente para estudiar la colitis amibiana o el absceso hepático, indican que los mecanismos de la respuesta inmune innata son de primordial importancia para el control de amibiasis (Asgharpour y col., 2005; Lotter y col., 2006). Sin embargo, la transferencia pasiva de anticuerpos en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) sugieren que los anticuerpos específicos son los mediadores primarios para controlar la infección amibiana (Zhang y col., 1994a; Lotter y col., 1997), mientras que otros estudios utilizando este mismo modelo de ratones SCID han demostrado que los neutrófilos son de gran importancia para limitar el daño tisular en el absceso hepático amibiano (Seydel y col., 1997). Estudios

in vitro muestran que *E. histolytica* lisa a los macrófagos y neutrófilos en reposo, pero cuando estos son activados previamente con INF- γ o TNF- α , conjuntamente con la adición de LPS o antígenos amibianos adquieren potencialidades amebicidas (Guerrant y col., 1981; Salata y Ravdin, 1986; Denis y Chadee, 1989; Ghadirian y Bout, 1989; Ghadirian y Denis, 1992). Experimentos también *in vitro* han sugerido que la muerte de los trofozoitos amibianos inducida por los macrófagos activados está mediada por óxido nítrico (Lin y col., 1994), resultado que es consistente con los obtenidos de estudios con ratones knockout para INF- γ y para iNOS (Seydel y col., 2000), los cuales se vuelven más susceptibles a desarrollar abscesos hepáticos amibianos. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que se requiere de la activación de macrófagos y neutrófilos para producir óxido nítrico en el control de la infección amibiana. Por lo resulta razonable asumir que la inducción de una respuesta de células T específica y la activación de macrófagos y neutrófilos constituye un componente crítico para conferir una protección contra el absceso hepático amibiano después la vacunación con proteínas amibinas (Lotter y Tannich, 2006).

1.9.3 Estrategias vacunales contra *E. histolytica*.

Se considera que el mayor problema que se tiene para controlar la amibiasis, es la falta de una vacuna que sea capaz de prevenir la transmisión del parásito o al menos evitar la progresión de los individuos infectados a etapas invasivas de la enfermedad (Lotter and Tannich, 2006).

Sin embargo, el hecho de que este parásito tenga un ciclo de vida relativamente sencillo, comparado con otros parásitos, la ausencia de hospederos intermediarios y su localización extracelular en las células del hospedero unido a que entre sus mecanismos evasivos a la respuesta inmune no se ha detectado el conocido como variación antigénica, ha hecho pensar a los investigadores que una vacuna efectiva contra la amibiasis pudiera ser alcanzada en un menor plazo que las vacunas contra otros parásitos protozoarios (Snow and Stanley, 2006). Pero existen una serie de retos a resolver antes de generar una vacuna contra esta parasitosis. El control de esta enfermedad requiere prevenir la infección inicial que se produce a nivel de las paredes mucosales del colon y la invasión de la barrera mucosa para prevenir la forma severa de la enfermedad ya que si la vacunación (o la infección natural) produce anticuerpos mucosales capaces de bloquear la adherencia del parásito a las células del epitelio intestinal, no se establecerá la infección y de esta forma se evita la enfermedad intestinal y extraintestinal. A favor de esta hipótesis se tiene los resultados experimentales que demuestran que los anticuerpos IgA aislados de la saliva de pacientes con amibiasis intestinal pueden bloquear la adherencia de los trofozoitos amibianos a las células blanco (Carrero y col., 1994). Además, se requiere que la vacuna genere una respuesta inmune protectora, lo cual se ha demostrado que es posible a través de experimentos en modelos animales como se describirán a continuación y por los estudios clínicos realizados en Bangladesh, los cuales sugieren que

aquellos individuos con anticuerpos IgA mucosales específicos contra la lectina de 260 kDa de *E. histolytica*, tienen un menor riesgo de adquirir una reinfección con este parásito (Haque y col., 2001).

Teniendo todo lo anteriormente expuesto en consideración, las estrategias vacunales se han enfocado en evaluar moléculas amibianas identificadas como importantes factores de virulencia y que sean capaces de inhibir o prevenir la infección o la formación de abscesos hepáticos en modelos experimentales. Dentro de las moléculas más importantes que están siendo estudiadas como potenciales candidatos vacunales se encuentran:

La lectina Gal/GalNAc: Esta lectina es una proteína de la superficie celular que tiene la habilidad de unirse a galactosa (Gal) y N-acetil galactosamina (GalNAc) (Petri y col., 2002). Es un heterodímero de 260 kDa, que posee una subunidad pesada de 170 kDa que se une mediante enlaces disulfuros a una subunidad ligera de 35 o 31 kDa y de manera no covalente a una subunidad intermedia de 150 kDa (Petri y col., 2002). Esta lectina tiene un papel importante en la patogénesis de la amiba y se reporta que tiene varias funciones. Participa en la invasión de la pared intestinal y en la resistencia al ataque del sistema del complemento (Braga y col., 1992). Participa también en la adherencia a neutrófilos y bacterias, demostrándose que las propiedades de adherencia corresponden a una región rica en cisteínas que se encuentra en la subunidad pesada (Guerrant y col., 1981a; Bracha y Mirelman, 1983; Chadee y col., 1987; Mann y col., 1993). Al bloquear la actividad de la lectina con galactosa o N-

acetil galactosamina se evita la citotoxicidad dependiente de contacto (Ravdin y Guerrant, 1981), mientras que la disminución de la expresión de la subunidad ligera de esta proteína disminuye la virulencia de la amiba mediante un mecanismo independiente a la disminución de la adherencia a la célula blanco (Padilla-Vaca y col., 1999). Varios estudios se han desarrollado utilizando la lectina nativa o varios fragmentos recombinantes provenientes de la cadena pesada de la misma. Los ensayos realizados utilizaron diferentes métodos de purificación, dosis de antígenos, esquemas de inmunización, rutas de administración combinado con diferentes dosis y grado de virulencia de las amibas usadas en el reto (Gaucher y Chadee, 2003). Los resultados más relevantes obtenidos con esta proteína son los siguientes. La inmunización de jerbos con la lectina nativa indujo una protección del 66% contra la formación de abscesos hepáticos amibianos frente a un reto intrahepático con trofozoitos virulentos de *E. histolytica*, aunque en el resto de los animales se observó un incremento significativo en el tamaño de los abscesos hepáticos, lo que sugiere que la respuesta inmune contra una parte de esta molécula puede exacerbar la enfermedad (Petri y Ravdin, 1991), por lo que la identificación de los componentes óptimos de esta lectina a utilizar como vacuna es de crucial importancia para el éxito de la inmunización. La administración de tres dosis intraperitoneales de un péptido de 25 aminoácidos de esta lectina con adyuvante completo de Freund a jerbos, indujo una disminución significativa del tamaño de los abscesos hepáticos formados frente a un

reto intrahepático con *E. histolytica* y los anticuerpos generados indujeron también protección por transferencia pasiva en un modelo murino (Lotter y col., 1997). Experimentos realizados con una porción recombinante de la subunidad pesada de esta lectina y denominada LC3, administrados intraperitonealmente con Titermax como adyuvantes indujo una protección del 71% en jerbos retados intrahepáticamente (Soong y col., 1995a). Los estudios realizados con un péptido de 25 aminoácidos procedente de la region rica en cisteinas de la cadena pesada de esta lectina y acoplado covalentemente a KLH, mostraron que al ser administrado parenteralmente indujo una protección total contra la formación de abscesos hepáticos en el 33% de los jerbos retados, mientras que el resto de los animales desarrollaron abscesos menores que los controles (Lotter y col., 2000). Mientras que utilizando un fragmento que contenía los 13 aminoácidos del extremo N-terminal de este péptido fusionado a la subunidad B de la toxina del cólera también permitió inhibir la formación de abscesos hepáticos amibianos administrándose tanto por la ruta parenteral como por la oral, aunque no se obtuvo una significativa respuesta IgA específica contra este antígeno (Lotter y col., 2000).

Con respecto a la respuesta inmune mucosal, se ha evaluado la respuesta generada al administrar la lectina nativa o un fragmento de la subunidad pesada de la misma denominado LecA (aminoácidos 578 al 1154) por la vía intranasal o intraperitoneal en el modelo murino C3H de colitis amibiana (Haupt y col., 2004). Los resultados indicaron que ambas formulaciones

indujeron protección contra la formación de colitis amibiana frente a un reto intracecal con trofozoítos de la cepa HM1:IMSS, aunque con la lectina nativa se obtuvieron los mejores resultados (Haupt y col., 2004). En este mismo estudio se observó que la presencia de anticuerpos IgA específicos contra la lectina antes del reto correlacionó con la protección, aunque este correlato no fue total, ya que algunos ratones protegidos no tuvieron niveles significativos de IgA antes del reto (Haupt y col., 2004).

También se ha evaluado este antígeno utilizando vacunas de DNA, para ello se optimizó la secuencia con la frecuencia de codones de mamíferos (jerbos) y se construyó una vacuna optimizada que codifica para un fragmento de la cadena pesada de esta lectina, incluyendo el dominio rico en cisteínas. Esta vacuna se utilizó para inmunizar ratones por la vía intradérmica y se observó que los ratones inmunizados desarrollaron una respuesta inmune celular de tipo Th1 y desarrollaron anticuerpos capaces de reconocer a un fragmento recombinante de la cadena pesada de esta lectina, así como de inhibir *in vitro* la adhesión de trofozoítos a células CHO (Gaucher y Chadee, 2002).

La proteína rica en serinas de *E. histolytica* (SREHP): esta proteína como su nombre indica contiene un alto número de residuos de serina (52 de los 233 aminoácidos que la componen) y además posee secuencias centrales de ocho o doce aminoácidos repetidos en tandem y muy conservados que están flanqueadas por aminoácidos cargados (Stanley y col., 1990). Posee múltiples modificaciones postraduccionales, como

fosforilaciones, acetilaciones y posee residuos de N-acetilglucosamina (Stanley y col., 1990; Stanley y col., 1995). Esta proteína se encuentra localizada fundamentalmente en la membrana del trofozoito amibiano (Stanley y col., 1995a). La función exacta de esta proteína permanece desconocida, aunque se ha demostrado que constituye un quimioatrayente para los trofozoitos amibianos (Stanley y col., 1995a) y media la unión de las amibas a las células eucariontes (Zhang y col., 1994a). En pacientes con AHA, aproximadamente el 80% tiene anticuerpos que reconocen a SREHP (Stanley, 1997) y muchos de los epítomos reconocidos por los sueros de estos pacientes se encuentran localizados en la regiones repetidas en tandem (Wang y col., 1997). Estas características de localización superficial, su capacidad de inducir anticuerpos que inhiben la adherencia a células eucariontes y la presencia de epítomos conservados indicaron que esta molécula era un buen candidato vacunal (Stanley, 1997).

Teniendo en cuenta lo anterior, muchos intentos se han realizados encaminados a desarrollar sistemas de administración mejorados para una vacuna basada en esta proteína, los cuales han incluido el clonaje y expresión de esta proteína como proteína de fusión a *trpE*, a glutathion S-transferasa (GST) y a la proteína de unión a maltosa (MBP). La proteína recombinante en la forma SREHP-MPB, ha mostrado ser una vacuna efectiva que previene la formación de abscesos hepáticos usando como modelo de estudio al jerbo, mostrando que el 85% de los animales

vacunados intraperitonealmente con esta proteína quedaron completamente protegidos frente a un reto intrahepático con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (Zhang y col., 1994; Zhang y col., 1994b). Además, la inmunización pasiva de ratones SCID con anticuerpos específicos contra esta proteína recombinante también resultaron protegidos contra la formación de abscesos hepáticos amibianos, sugiriendo que estos anticuerpos podrían ser los responsables de la protección observada (Zhang y col., 1994a). La seguridad e inmunogenicidad de esta proteína recombinante fue también evaluada en monos verdes africanos, los cuales no mostraron efectos colaterales y presentaron una reacción local mínima en el sitio de inoculación atribuido fundamentalmente al adyuvante usado (adyuvante completo de Freund) (Stanley y col., 1995). Los monos inmunizados desarrollaron altos títulos de anticuerpos anti-SREHP y anti-amibas, además estos anticuerpos reconocieron a la molécula nativa en trofozoítos amibianos y fueron capaces de bloquear su adhesión a células de mamíferos (Stanley y col., 1995).

También se expresó esta proteína y la MBP en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*, la cual se utilizó para inmunizar ratones y jerbos mediante tres dosis orales (Zhang y col., 1996). Tanto los ratones como los jerbos inmunizados fueron capaces de producir una respuesta IgA específica contra la amiba a nivel intestinal así como anticuerpos IgG anti amibas a nivel sistémico (Zhang y col., 1996). De los jerbos vacunados sólo

el 22% desarrollaron AHA frente a un reto intrahepático con trofozoítos virulentos (4/18) y el tamaño de los abscesos formados en estos fueron menores que en el grupo control donde todos los animales desarrollaron AHA (Zhang y col., 1996).

Otros intentos han estado encaminados a desarrollar una respuesta inmune a nivel mucosal. La SREHP genéticamente fusionada a la subunidad A2 de la toxina del cólera fue capaz de formar una holotoxina quimérica al ser coexpresada con la subunidad B de la toxina del cólera (Sultan y col., 1998). Al administrar esta holotoxina por vía oral en ratones, se indujo la producción de anticuerpos IgA que reconocen a los trofozoítos amibianos (Sultan y col., 1998), pero hasta la fecha no se han realizados estudios de eficacia con respecto a la prevención de la amibiasis intestinal o a la formación de abscesos hepáticos amibianos usando esta construcción.

Una variante a la anterior fue el uso de una cepa viva atenuada de *Vibrio cholerae*, así como la toxina. Se produjo una cepa viva atenuada (Peru2) capaz de expresar un dodecapeptido de SREHP fusionado a CTB en el sobrenadante, mediante el uso de plásmidos o integración en el cromosoma de la bacteria (Ryan y col., 1997). Esta cepa fue administrada por vía oral en ratones aplicando una o dos dosis, sin ningún otro adyuvante. Los ratones que recibieron dos dosis con la cepa que tenía el plásmido para la expresión de la proteína de fusión fueron lo que dieron mejor respuesta sistémica y mucosal contra la amiba (Ryan y col., 1997), además de producir respuesta específica contra *V. cholerae*.

Otra estrategia seguida con esta proteína fue el desarrollo de una vacuna de DNA, usando un plásmido que codifica para toda la SREHP. Esta vacuna fue utilizada para inmunizar ratones y jerbos intramuscularmente. Los animales vacunados desarrollaron anticuerpos y respuesta inmune celular específica contra los trofozoítos amibianos. El 80% de los ratones y el 60% de los jerbos vacunados quedaron protegidos contra la formación de abscesos hepáticos amibianos (Zhang y col., 2000a).

Lipofosfoglicanos/proteofosfoglicanos: *E. histolytica* posee lipofosfoglicanos (LPG) y proteofosfoglicanos (PPG) de estructura única anclados en su superficie (Zhang y col., 2002). Estas moléculas son muy abundantes en los trofozoítos de *E. histolytica* y contienen en su estructura grupos fosfatos, azúcares y un componente peptídico que se une a la membrana mediante un anclaje formado por un grupo glicofosfatidilinositol (GPI), que es diferente a los observados en otras células eucariontes (Stanley y col., 1992; Isibasi y col., 1982). Se ha demostrado que estas moléculas son muy inmunogénicas y que los anticuerpos dirigidos contra las mismas son capaces de bloquear la adherencia amibiana a células de mamíferos (Stanley y col., 1992). La inmunización pasiva de ratones SCID con un anticuerpo monoclonal dirigido contra esta molécula amibiana los protegió de desarrollar abscesos hepáticos frente a un reto intrahepático con trofozoítos virulentos (Marinets y col., 1997), mientras que una combinación de inmunización pasiva con inmunización activa usando LPG protegió a ratones SCID-HU-INT contra la colitis amibiana (Zhang y col.,

2002). La inmunización también indujo una reducción en el daño tisular y una disminución en el daño a la permeabilidad de la barrera intestinal (Marinets y col., 1997). Se han identificados péptidos que mimetizan la estructura de PPG/LPG amibianos, y con estos se han generado anticuerpos que son capaces de reconocer los PPG nativos de *E. histolytica* (Melzer y col., 2002; Melzer y col., 2003). Otros estudios han mostrado que los PPG/LPG amibianos son capaces de unirse a los TLR-2 y TLR-4 humanos estimulando la respuesta inmune innata (Maldonado-Bernal y col., 2005).

La proteína de 29 kDa de *E. histolytica*: Esta proteína es rica en residuos del aminoácido cisteína y su localización celular no esta clara hoy en día, ya que se ha encontrado en diferentes lugares dentro de la célula. Su función se ha relacionado con la inactivación de peróxido de hidrógeno (Stanley, 1997).

La inmunización intraperitoneal de jerbos con tres dosis de esta proteína recombinante conjuntamente con adyuvante TiterMax indujo la producción de anticuerpos IgG séricos en todos los animales vacunados. De estos animales vacunados el 30% desarrolló AHA frente a un reto intrahepático con trofozoítos virulentos. Los abscesos desarrollados en los animales vacunados fueron de igual tamaño a los encontrados en el grupo control (Soong y col., 1995).

Amebaporos amibianos: Los amebaporos constituyen un grupo de polipéptidos con capacidad de formar poros en la membrana de las células

procariontes y eucariontes, constituyendo importantes factores de virulencia de *E. histolytica* (Andra y col., 2004). La adición de amebaporos a células eucariontes produce necrosis y posiblemente apoptosis (Zhang y col., 2004). Mediante un mecanismo de silenciamiento de genes se creó una cepa mutante de *E. histolytica* que no expresa el amebaporo A (Zhang y col., 2004). Estas mutantes producen menores AHA en ratones SCID que la cepa silvestre. Interesantemente, esta mutante produce una infección en el colon de ratones SCID-HU-INT similar a la cepa silvestre, lo que indica que los amebaporos son necesarios para la virulencia amibiana en el AHA, pero no son necesarios para causar daño a nivel intestinal (Zhang y col., 2004). Al inocular esta forma mutante de *E. histolytica* en hámsteres por la vía intraperitoneal, no indujo AHA a diferencia de la silvestre que indujo AHA en todos los animales inoculados (Bujanover y col., 2003)

Cistein proteinasas de *E. histolytica* (CP): este parásito contiene un gran número de estas proteasas que son codificadas por 30 genes diferentes (Bruchhaus y col., 2003; Brendan Loftus y col., 2005). Las cistein proteasas amibianas pueden tener diferentes localización y funciones dentro de la célula y no todas son expresadas *in vitro* (Bruchhaus y col., 2003). Algunas CP amibianas pueden degradar componentes de la matriz extracelular (Moncada y col., 2003), pueden degradar además polímeros de MUC2, una glicoproteína que compone mayoritariamente la capa de mucus del colon (Moncada y col., 2003) y se ha demostrado que juegan un papel importante en la fagocitosis de eritrocitos (Ankri y col., 1998). Aunque,

solamente para la CP5 amibiana se ha demostrado una relación directa entre patogenicidad de la amiba y sus niveles de expresión (Ankri y col., 1999) y como esta enzima se encuentra localizada en la superficie del trofozoito, se le ha considerado como un candidato vacunal (Jacobs y col., 1998).

La inhibición de la expresión de esta cisteín proteasa amibiana mediante la utilización de una secuencia de DNA antisentido, produjo en los trofozoitos mutantes una pérdida en su capacidad de inducir la formación de AHA en hígados de hámster (Moncada y col., 2003). Además se observó que disminuye la producción de las citosinas inflamatorias IL-1 β e IL-8, y produce menos inflamación en el colon de ratones SCID-HU-INT (Zhang y col., 2000).

El complejo EhCPADH de *E. histolytica*: Esta proteína fue identificada mediante el uso de mutantes deficientes en adhesión y de anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos inhiben la adherencia de los trofozoítos a eritrocitos y células epiteliales. Esta proteína está afectada en mutantes deficientes en adhesión y es reconocida por el suero de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987). Se ha podido comprobar que esta proteína es un heterodímero compuesto por un polipéptido de 49 kDa (EhCP112) con actividad de cisteín proteasa y otro 78 kDa (EhADH112) con función de adhesina, los cuales están codificados por dos genes continuos separados uno de otro por una región no codificante de 188 bp (García-Rivera y col., 1999).

La proteína EhCP112, es un polipéptido de 446 aa, que posee en su estructura un segmento transmembranal putativo, un motivo RGD y un motivo tiol proteasa, además *in vitro* manifiesta actividad de cistein proteasa frente a gelatina, colágena tipo I, fibronectina y hemoglobina, así como tiene la capacidad de destruir monocapas de células MDCK y de unirse a los eritrocitos humanos (García-Rivera y col., 1999; Ocadiz y col., 2005). Los resultados experimentales muestran que este polipéptido es secretado por los trofozoitos amibianos, mientras que la proteína recombinante es reconocida por el suero proveniente de pacientes con amibiasis, pero no por el suero de sujetos sanos (Ocadiz y col., 2005). Todos estos resultados sugieren que esta proteína pudiera participar en el mecanismo patogénico de *E. histolytica*.

La otra proteína que conforma este complejo, la proteína EhADH112, contiene 687 aa y en su secuencia se han podido identificar tres posibles sitios de N-glicosilación. En su región N-terminal se encuentra un dominio Bro-1, mientras que hacia su extremo carboxilo Terminal se encuentra el dominio de adhesión, indicando que esta proteína pudiera participar en el mecanismo patogénico de la amiba así como en otros eventos de señalización intracelular (García-Rivera y col., 1999; Bañuelos y col., 2005). Mediante microscopia electrónica y ensayos de inmunofluorescencia empleando anticuerpos monoclonales se ha podido demostrar que durante la fagocitosis, la adhesina se transloca de la membrana hacia vacuolas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). Anticuerpos monoclonales dirigidos

contra esta adhesina inhiben la adherencia, la fagocitosis y el efecto citopático de los trofozoitos amibianos y sus extractos proteicos en un grado variable (García-Rivera y col., 1999; Madriz y col., 2004). La expresión en tomates del extremo carboxilo terminal de esta proteína (Adh240) mostró un polipéptido de 28 kDa, que es reconocido por anticuerpos específicos y que conserva la capacidad de inhibir la adherencia (32.8%) y la fagocitosis (44.75%) de los trofozoitos amibianos a las células blanco (Carrillo-Landell y col., 2008).

La inmunización con un polipéptido de la EhADH112 formado por los últimos 243 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal y que incluye el epítipo de adhesión, produjo una respuesta inmune humoral que reconoce tanto al polipéptido recombinante como al complejo EhCPADH en extractos proteicos totales de trofozoitos. Estos anticuerpos específicos fueron capaces además de inhibir la adherencia, la fagocitosis y la destrucción de monocapas de células MDCK por parte de los trofozoitos vivos (experimentos *in vitro*). La respuesta inmune producida fue parcialmente protectora frente a un reto intraportal con trofozoitos de la cepa HM1:IMSS (Martínez-López y col., 2004)

En estudio similar inmunizando con los genes codificantes para el complejo EhCPADH, por separado y conjuntamente se pudo evidenciar que se produce una respuesta inmune humoral y celular específica contra *E. histolytica*, destacándose que la co-inmunización de los dos genes produjo

una respuesta IgG específica significativamente mayor contra los trofozoitos a pesar de que no hubo un incremento significativo en la respuesta inmune celular. Sorprendentemente sólo se observó una reducción significativa del daño hepático, frente a un reto intraportal con trofozoitos de la cepa HM1:IMSS, en el grupo que recibió la mezcla de los genes (Madriz y col., 2004).

2. Justificación.

La amibiasis es causada por el parásito *E. histolytica*, siendo la principal manifestación clínica primaria de la infección sintomática la disentería y la colitis, que en el 10% de los casos puede llegar a producir abscesos hepáticos. La amibiasis representa un grave problema de salud pública para el que no se tiene solución inmediata, a pesar de contar con una quimioterapia efectiva. La inmunización es la medida más eficaz y de mejor balance costo-beneficio de que se dispone para enfrentar el problema de las enfermedades infecciosas, sin embargo todavía el mundo no cuenta con una vacuna contra la amibiasis y las cifras de muerte y enfermedad por esta causa continúan en ascenso.

El desarrollo de una vacuna efectiva contra la amibiasis pudiera teóricamente resultar en la completa eliminación de este parásito, ya que el organismo humano constituye el reservorio primario y no se conocen otros animales intermediarios en el ciclo de vida de la amiba.

Se ha demostrado que la adhesión de los trofozoitos de *E. histolytica* a las células blanco de la mucosa intestinal, constituye el primer paso en el proceso de colonización y de invasión de los tejido (Orozco y col., 1980), en la citólisis dependiente de contacto y en la fagocitosis (Ravdin y col., 1988). Además que las cistein-proteasas de este parásito constituyen un importante factor de virulencia y contribuyen a los mecanismos evasivos que el mismo pone en acción frente a la respuesta inmune específica. Por lo que el empleo de proteínas como el complejo EhCPADH, la que contiene un

fragmento con actividad de adhesina y otro con actividad de cistein proteasa, constituye un buen modelo para alcanzar una inmunidad efectiva contra la amibiasis. Experimentalmente se ha demostrado que esta proteína tiene una amplia participación en el mecanismo de virulencia de la amiba y además ha resultado una molécula inmunogénica, que produce una reducción significativa del daño hepático en modelos animales.

El presente trabajo está dirigido a profundizar en el estudio de las propiedades inmunológicas de esta proteína así como en los mecanismos por los cuales manifiesta la protección frente a la infección amibiana para obtener una formulación vacunal efectiva contra esta enfermedad.

3. Hipótesis

La inmunización de hámsteres con una vacuna de ADN que codifica el complejo proteico EhCPADH, induce una respuesta protectora que depende esencialmente de la respuesta inmune celular.

4. Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar la respuesta inmune inducida por la inoculación de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* en el modelo de absceso hepático en hámster.

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión *in vivo* de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en hámsteres inmunizados con los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.
2. Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización con los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* en el modelo de absceso hepático en hámster.
3. Caracterizar el patrón de respuesta inmune celular generado por la inmunización con los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* en hámsteres.
4. Evaluar el efecto de la ruta de inoculación y la capacidad protectora de los inmunógenos frente a un reto con trofozoítos amibianos de la cepa HM1:IMSS.

5. Materiales y métodos.

5.1. Plásmidos.

Utilizamos los plásmidos de expresión en procariontes *pcDNA3* (Invitrogen, USA), *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, los cuales fueron construidos y descritos por Madriz y colaboradores con anterioridad (Madriz y col., 2004). El plásmido *pcDNA-Ehcp112* codifica el marco de lectura completo de la cistein proteasa EhCP112 de *E. histolytica*, mientras que el plásmido *pcDNA-Ehadh112* permitió la expresión de 586 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína EhADH112 de este mismo parásito.

También se utilizaron los plásmidos de expresión en procariontes *pTrcHisC-Ehcp112* (Ocadiz y col., 2005), el cual permitió la expresión en bacterias del marco de lectura completo de la proteína EhCP112 fusionado a una etiqueta de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal y el plásmido *pPRSTadh729* (Martínez-López y col., 2004), que permitió la expresión del polipéptido recombinante EhADH243, el cual comprende los últimos 243 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la adhesina EhADH112 fusionado a una etiqueta de histidinas en su extremo N-terminal.

5.2 Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*).

En este trabajo experimental se utilizaron las siguientes cepas *E. coli* DH5 α con genotipo F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1. Esta cepa permite la amplificación eficiente de plásmidos. La cepa BL21(DE3)pLysS

con genotipo F⁻, ompT, hsdSB (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr. Esta cepa puede ser usada con vectores de expresión que se encuentran bajo el control del promotor T7, ya que es lisogénica para lambda-DE3, que contiene el gen 1 del bacteriofago T7 y codifica para la T7 RNA polimerasa. Además contiene el plásmido pLysS, que porta el gen de la lisosima T7, lo cual permite disminuir los niveles de expresión basales de los genes de interés clonados bajo el control del promotor T7, pero no interfiere con los niveles de expresión logrados mediante la inducción de la expresión con IPTG.

5.3. Preparación de células competentes de *E. coli*.

Para la preparación de las células competentes de *E. coli*, las cuales permitieron la transformación con el DNA plasmídico recombinante anteriormente descrito, sembramos células de las cepas DH-5α o BL21(DE3) pLysS en cajas Petri con medio Luria Bertaini (LB) (10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 14 g de bactoagar en un litro de agua desionizada, pH 7.6) y se incubaron durante 16 h a 37° C. Trascurrido este tiempo, una colonia se sembró en 5 ml medio LB líquido (LB sin bactoagar) y se incubó con una agitación constante de 240 rpm a 37° C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO) de 1.0 a 550 nm, entonces se realizó una dilución 1:20 de este cultivo con medio LB líquido y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzara una DO de 0.5 a 550 nm. Las células se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 10 000 rpm en una centrifuga Beckman (rotor JA20)

durante 5 min a 4° C. El sobrenadante de cultivo se desechó y la pastilla celular obtenida se resuspendió en 40 ml de solución Tfb1 (acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y 15 % de glicerol, pH 5.8) y se incubó en este mismo tampón durante 5 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a nuevamente a 10 000 rpm durante 5 min a 4° C. La pastilla resultante se resuspendió en 4 ml de solución Tfb2 fría (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM y 15 % de glicerol, pH 6.5) y se incubó 15 min en hielo. La suspensión celular se homogeneizó y se distribuyó en alícuotas de 200 µl las cuales se guardaron a -70° C hasta su uso.

5.4. Transformación de células competentes de *E. coli*.

Para transformar las bacterias de *E. coli*, con los plásmidos anteriormente descritos, 50 µl de las células competentes se mezclaron con 100 ng de los plásmidos y se incubaron durante 30 min en hielo, transcurrido este tiempo se les aplicó un choque térmico de 90 segundos a 42 °C. Las bacterias se incubaron inmediatamente en hielo, donde se mantuvieron durante 4 min, después se les adicionó 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 h bajo agitación constante de 240 rpm a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las células se sembraron sobre medio LB sólido conteniendo el antibiótico de selección apropiado, las cajas se incubaron a 37° C durante 18 h y posteriormente se almacenaron a 4° C.

5.5 Purificación de DNA plasmídico.

Para la purificación de grandes cantidades del DNA plasmídico se utilizó el kit comercial QIAGEN Mega-Plasmid columns (QIAGEN, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido que se quería purificar se inoculó en 5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico de selección apropiado y se incubó a 37° C bajo agitación constante de 240 rpm durante 18 horas, transcurrido este tiempo se realizaron diluciones 1/100 para inocular cultivos de 1l en medio LB conteniendo el antibiótico de selección apropiado. El cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 16 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10500 x g durante 15 min a 4° C, el sobrenadante de cultivo se decantó y la pastilla celular resultante se resuspendió en 50 ml de tampón P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa a 100 µg/ml), se incubaron 5 min en hielo y a continuación se le adicionaron 50 ml de amortiguador P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión suave y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió a la mezcla anterior 50 ml de amortiguador P3 (acetato de potasio 3 M pH 5.5), se agitó suavemente y se incubó durante 30 min a 4° C. Seguidamente las muestras se centrifugaron a 10 500 x g durante 30 min a 4° C, el sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico, se filtró a través de varias capas de gasa estéril y se aplicó a una columna previamente equilibrada con 35 ml de la solución amortiguadora QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM

pH 7.0, isopropanol 15% y Tritón X-100 0.15%), posteriormente la columna se lavó con 100 ml del tampón QC (NaCl 1M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15%). El DNA se eluyó de la columna con 35 ml del tampón de elusión QF (NaCl 1.25M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, isopropanol 15 %), se precipitó con 24.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó inmediatamente a 10 000 x g durante 30 min a 4° C. La pastilla resultante se lavó con 7 ml de etanol al 70 %, se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min y se dejó secar a temperatura ambiente unos 15 min. Transcurrido este tiempo, el DNA se resuspendió en 500 µl de agua estéril. La pureza y concentración del DNA obtenido se determinó por análisis espectrofotométrico registrando la absorbancia de la muestra a 260/280 nm. El DNA también se analizó mediante restricción enzimática, electroforesis en geles de agarosa y análisis densitométrico.

5.6. Análisis de DNA plasmídico en geles de agarosa.

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % siguiendo el método de Sambrook (Sambrook y col., 1989), en cámaras horizontales de electroforesis (Owl Scientific, USA). La agarosa (BioRad, EUA) se mezcló en tampón de corrida TBE 1X (Tris-HCl 89 mM pH8, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8), se fundió a 60 °C y se dejó enfriar hasta los 50 °C, se le agregó bromuro de etidio (Sigma,EUA) hasta una concentración final de 0.5 µg/ml. La solución se dejó solidificar en los moldes destinados para este fin.

Las muestra de DNA se disolvieron con 0.1 volumen de solución de carga (Glicerol al 50 %, azul de bromo fenol al 0.25 %, xilen-cianol al 0.25 %, (Sigma, EUA)) y se corrieron electroforeticamente a 10 V/cm de distancia entre los electrodos.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron DNA del fago λ digerido con la enzima *Hind* III (New England Biolabs), Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, USA) y el Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA). El DNA separado se visualizó por irradiación con luz U.V de 310 nm y se registró en el documentador GelDoc 1000 (BioRad, USA). Con el software de este mismo equipo se realizaron los análisis densitométricos.

5.7. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243.

Para la expresión y purificación de las proteínas recombinante se siguió la metodología descrita previamente por Ocadiz y col. (2005) y Martínez-López y col. (2004).

Las células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) pLysS (Novagen, USA) previamente transformada con el plásmido *pTrcHisC-Ehcp112* (Ocadiz y col., 2005) o con el plásmido *pPRSTadh729* (Martínez-López y col., 2004) se inocularon en 10 ml de medio LB conteniendo 50 μ g/ml de ampicilina y 35 μ g/ml de cloranfenicol y se incubaron a 37° C durante 18 h bajo agitación a 240 rpm. Transcurrido este tiempo, 5 ml de este pre-cultivo se inoculó en 500 ml de medio de cultivo LB con los mismos antibióticos de selección y se le permitió crecer en las mismas condiciones hasta alcanzó una densidad

óptica de 0.5 a 600 nm. En este momento se extrajo una alícuota de cultivo y al resto se le adicionó isopropil β -D-galactopiranosido (IPTG, Sigma, EUA) a una concentración final de 1 mM. Se continuó su crecimiento en las mismas condiciones durante 3 h. Transcurrido este tiempo, el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 12 000 x g a 4° C, el medio de cultivo se desechó y con el paquete celular se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

La inducción de las proteínas recombinantes se comprobó sonicando la pastilla celular con 6 ciclos de 30 s cada uno a una potencia de 90 watt y separando el extracto proteico obtenido en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12 % o mediante Western blot usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de histidinas (Invitrogen, USA).

La purificación de las proteínas se realizó bajo condiciones desnaturalizantes a través de una columna de afinidad Ni-NTA (Qiagen, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

El botón celular correspondiente a una alícuota de 200 ml de un cultivo inducido se descongeló y se resuspendió en 10 ml de tampón A (hidrocloruro de guanidinio 6M, NaH₂PO₄ 0.1 M, Tris-Base 0.1M pH 8), se incubó bajo agitación suave a temperatura ambiente durante 1 h, transcurrido este tiempo se completó la lisis celular sonicando la muestra con 3 ciclos de 30 s cada uno y una potencia del 90 watt usando un sonicador Vibra Cell (Sonics, USA). Entonces la muestra se centrifugó en un equipo Beckman (J2-HS, EUA) a 10 000 g y 4°C. El sobrenadante se

recuperó y se dejó interactuar durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 ml de la resina Ni-NTA previamente equilibrada con el tampón A. Transcurrido este tiempo, la mezcla se pasó a una columna y se continuó lavando con el tampón A hasta obtener la línea base a 280 nm. Seguidamente se realizaron lavados con los tampones B (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-Base 0.1 M pH 8), C (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-Base 0.1 M pH 6.3), D (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-Base 0.1 M pH 5.9), E (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-Base 0.1 M pH 4.5) y finalmente la proteína de interés se eluyó con el tampón F (hidrocloruro de guanidinio 6 M, ácido acético 0.2 M). La proteína eluida fue dializada contra PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2HPO_4 8 mM, pH 7.4) (3 cambios de 6 h cada uno), la concentración de la proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976) y se conservó a -20°C hasta su uso.

Las proteínas purificadas fueron caracterizadas mediante SDS-PAGE y Western blot.

5.8. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (1976). Se preparó una curva patrón por triplicado adicionando cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, EUA) 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μg a partir una solución de BSA de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A cada tubo se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 50 mM para alcanzar un volumen final de 100 μl y seguidamente se adicionó 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie, 50 ml de etanol al 95 %, 100 ml de ácido

fosfórico al 85 %), los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron en reposo durante 2 min a temperatura ambiente. Después se determinó la absorbancia de las muestras medidas a 595 nm en el espectrofotómetro (Beckman, DU-650, EUA). Los resultados de absorbancia obtenidos se graficaron contra la concentración correspondiente. Para medir la concentración de las proteínas de interés se tomaron alícuotas de 3 µl de cada muestra y se siguió el mismo procedimiento. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón, determinando así las cantidades de las proteínas en estudio.

5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras usando el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Para el análisis electroforético de las proteínas se usó una modificación del método descrito por Laemmli (1970). Las proteínas fueron separadas en geles discontinuos de poliacrilamida, utilizando como agente desnaturizante el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Para crear el gel separador se usaron las siguientes soluciones: 12% de una solución acrilamida/N,N' metilen bis acrilamida al 30%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1 %, PSA 0.05 % y TEMED 0.005 %, mientras que en la elaboración del gel concentrador se usó 5% de una solución acrilamida/N,N' metilen bis acrilamida al 30%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1%, PSA 0.05% y TEMED 0.005%. Los geles se prepararon en un sistemas para minigeles de BioRad (Miniprotean II System, EUA)

adicionando el tampón de corrida 1X (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS al 0.1 %) y aplicando en cada carril 30 µg de las muestras de proteínas previamente preparadas con el tampón de carga (250 mM de Tris (pH 6,8), 50 mM de ditioneitol (DTT), 10% de dodecil sulfato sódico (SDS), 0,5% de azul de bromofenol y 50% de glicerol). Los geles se corrieron a 60 V hasta que la muestra cruzó el gel concentrador y a 100 V hasta que el colorante de la solución amortiguadora de corrida llegó aproximadamente a 0.5 cm del extremo inferior del gel.

5.10. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

Los geles se sumergieron durante 30 min en una solución que contenía azul de Coomassie R-250 al 0.25 % disuelto en una solución que contenía metanol al 45 % y ácido acético al 10 %, y posteriormente fueron desteñidos en una solución compuesta por metanol al 30 % y ácido acético al 10% realizando varios lavados bajo agitación constante hasta obtener el contraste deseado en las bandas teñidas de azul intenso sobre un fondo azul claro.

5.11. Ensayos de inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa (Western blot)

La transferencia de las proteínas separadas mediante electroforesis se realizó siguiendo una modificación de la técnica descrita por Towbin y col. (1979).

Una vez concluida la separación electroforética de las proteínas, el gel de acrilamida se retiró de la cámara de electroforesis y se equilibró durante 30 min en el tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM pH 8.3, metanol al 20 %). Transcurrido este tiempo, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa usando el mismo tampón y una cámara de transferencia (Mini trans-blot, BioRad). La transferencia se realizó a una corriente constante de 300 mA durante 1 h a 4° C. Al finalizar la transferencia la membrana fue teñida con una solución de rojo ponceau S en ácido acético al 1% para verificar la eficiencia de la transferencia y desteñida aplicándole varios lavados con PBS. Posteriormente, los sitios inespecíficos fueron bloqueados incubando la membrana de nitrocelulosa en una solución de leche descremada al 3% en PBS-Tween20 durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la membrana se incubó con el primer anticuerpo (monoclonal de ratón IgG dirigido contra la etiqueta de histidinas) diluido en leche al 1% en PBS-Tween durante 16 h a 4° C y bajo agitación suave. Terminada la incubación, se realizaron tres lavados con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Zymed, EUA)) diluido en leche al 1% en PBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se reveló con solución que contenía 0.5 mg/ml de diaminobencidina (Sigma, EUA) y peróxido de hidrógeno al 0.01 %. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua bidestilada.

5.12. Animales y esquemas de inmunización.

En nuestros experimentos utilizamos hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*) machos de 4 a 5 semanas de edad, los cuales fueron tomados al azar para formar grupos de 8 o 10 animales según el estudio a realizar. Todos los animales fueron mantenidos en jaulas de plástico estériles y se les suministró alimento y agua estériles *ad libitum* según el protocolo 0313/06 aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CICUAL) y acorde con la norma oficial para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se inocularon dos veces con un intervalo de 20 días, mediante la inyección en la base de la cola (ruta intradérmica) o en ambos músculos tibiales anteriores (ruta intramuscular) de 100 μ L de PBS conteniendo una mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112/pcDNA-Ehadh112* (100 μ g/100 μ g) o conteniendo 200 μ g del plásmido control *pcDNA3*, usando jeringas de 1 ml.

5.13. Evaluación de la expresión *in vivo* del RNAm de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en hámsteres inmunizados.

Para investigar la expresión *in vivo* de los transgenes usamos grupos de 8 hámsteres que fueron inoculados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112/pcDNA-Ehadh112* o el plásmido control *pcDNA3*, los animales fueron sacrificados a las 18 h, 7 días y 21 días después de la primera

dosis, se les extrajo el área del sitio de inoculación (piel o músculo), el baso y el hígado a partir de los cuales se extrajo el RNA total y realizamos ensayos de RT-PCR.

5.13.1. Obtención de RNA total.

Para la extracción del RNA total, los tejidos se homogeneizaron en Trizol (Invitrogen, USA) con ayuda de un politron. El homogeneizado se dejó reposar a 4 °C durante 10 min y se le adicionó 200 µl de cloroformo por cada mililitro de Trizol adicionado, se mezcló bien por inversión y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10323 g durante 15 min a 4 °C, recuperamos el sobrenadante y precipitamos el RNA adicionando un volumen igual de isopropanol e incubando la mezcla durante 20 min a -70 °C. Entonces se centrifugó a 10323 g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó con ayuda de una pipeta y el precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% en agua-DEPC y se centrifugó a 10323 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en tampón (20 mM Tris-HCL pH 8.4, 2mM MgCl₂, 50 mM KCl) y se trató con DNAsa durante 15 min a 37 °C, para eliminar cualquier contaminación con DNA genómico o plasmídico. Se precipitó nuevamente con isopropanol, se lavó con etanol al 70% en agua-DEPC. Finalmente, el precipitado se resuspendió en agua-DEPC y se conservó a -70 °C hasta su uso. El RNA fue cuantificado espectrofotométricamente mediante lectura de la absorbancia a 260 nm de una dilución 1/1000 de cada muestra. Su integridad fue evaluada en geles de agarosa con formaldehído.

5.13.2. Análisis de la expresión de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* mediante PCR en tiempo real.

Para analizar la expresión *in vivo* de los transcritos *Ehcp112* y *Ehadh112*, se utilizaron muestras de tejidos del sitio de inoculación (piel o músculo), del bazo y del hígado de los animales sacrificados a las 18 h, a los 7 y a los 21 días después de la vacunación con DNA. A partir de estos tejidos se extrajo el RNA total mediante la técnica de Trizol (Gibco BRL, USA) y se trató con DNAsa I como se describió anteriormente.¹

La reacción de retrotranscripción se realizó empleando 1 µg de RNA total y el kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN, USA) en un volumen final de 20 µl y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el análisis de la expresión génica se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real, empleando el sistema de detección ABI prisma 7300 (Applied Biosystem, USA) con placas de reacción de 96 pozos con cubierta óptica (Applied Biosystem, USA). Las reacciones se desarrollaron usando 1 µl/pozo de cada cDNA y 24 µl/pozo de una mezcla de reacción que contenía 12.5 µl de la mezcla maestra de PCR conteniendo SYBR green (Applied Biosystem, USA) y los oligonucleótidos específicos a una concentración final de 300 nM (Tabla 1) para completar un volumen de reacción final de 25 µl. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95 °C y 40 ciclos de amplificación de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 70 °C. Como control interno se amplificó un fragmento de 91 bp del gen constitutivo hipoxantina

fosforribosiltransferasa de hámster (*hprt*) utilizando iniciadores específicos (Tabla 1). Para facilitar la cuantificación incluimos en cada ensayo una curva estándar conteniendo 8 diluciones seriadas 1/10 del cDNA de los genes analizados (*hprt*, *Ehcp112* o *Ehadh112*) (cada punto por triplicado), también se incluyó un control negativo sin molde en cada ensayo. Los productos de PCR fueron sometidos a un análisis de disociación para confirmar la especificidad de las reacciones. Los niveles de expresión de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* se normalizaron con respecto a los niveles del gen *hprt* presente en cada muestra.

5.14. Análisis de la expresión *in vivo* de las proteínas EhCP112 y EhADH112 mediante inmunohistoquímica.

Para el análisis de la expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en la piel, el músculo, el bazo y el hígado en los hámsteres inmunizados, estos fueron sacrificados a las 18 h, 7 días y 21 días posteriores a la inmunización y los tejidos fueron fijados en etanol absoluto durante 48 h, pasados por xilol (tres cambios de 1 h cada uno) y finalmente incluidos en parafina. Se cortaron secciones de 4 µm con un microton RM2145 (LEICA). Para la detección de las proteínas, las secciones de tejidos fueron desparafinadas 20 min a 60 °C y seguidamente se realizaron lavados siguiendo la secuencia xilol, etanol, etanol 90% y agua. Las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno al 10% en metanol (4 cambios de 15 minutos cada uno) a temperatura ambiente, para eliminar la peroxidasa

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados en la amplificación de los genes *hprt*, *Ehcp112* y *Ehadh112*.

Cebadores	Tm (°C)	Amplicon (bp)
<i>hprt</i> sentido: 5'- AGATCCACTCCCATAACTGTAGATTTTAT -3' <i>hprt</i> antisentido: 5'-CATCCGCACCATTAATTTTAAAGTC-3'	56	91
<i>Ehcp112</i> sentido: 5'- CTGCACAACGTTTTCTTGATGTTA -3' <i>Ehcp112</i> antisentido: 5'- CTCGAGGATGACCACCACAA -3'	55	69
<i>Ehadh112</i> sentido: 5'- AAGCTGCTGGTGCATTCCA -3' <i>Ehadh112</i> antisentido: 5'- ATCACCCTACCTGCTGCACATA -3'	55	65

BIBLIOTECA UACM

endógena y seguidamente se incubaron con suero normal de cabra durante 30 min para bloquear las uniones no específicas. Transcurrido este tiempo, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo polyclonal de conejo anti-EhCP112 (1:2000) o anticuerpo polyclonal de conejo anti-EhADH112 (1:50)) a temperatura ambiente durante 16 h y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo biotinilado obtenido en cabra (1:200)) durante 1 h. Posteriormente se se trataron con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (Becta Satain ABC kit, Vector Laboratorios) durante 30 min y finalmente se tiñeron con diaminobencidina y 0.04% de peróxido de hidrógeno. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina y los resultados se registraron usando una cámara CCD Alpha (Innotech Corporation) acoplada a un microscopio Olympus BX40 y el software RS Image version 1.7.3 (Roper Scientific). Los controles se trataron en iguales condiciones pero incubando con suero normal de conejo, o sin incubar con el anticuerpo primario, o sin incubar con el anticuerpo secundario.

5.15. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos amibianos de la cepa HM1-IMSS (donada por el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Tamayo, Hospital General de México), previamente pasados por hígados de hámster para mantener su virulencia, fueron cultivados axénicamente a 37 °C, en tubos de vidrio de 16 x 25 mm o en cajas de poliestireno de 25 cm², en medio TYI-S-33 (Diamond y col., 1978)

suplementado con 16.6% de suero bovino, 3% de una mezcla de vitaminas (Special Diamond Vitamin Mixture, North American Biologicals, EUA), penicilina 0.25 UI/ml y estreptomicina 35 µg/ml, hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 72 h). Para todos los experimentos los trofozoitos amibianos fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento, mediante enfriamiento en hielo durante 10 min y centrifugación de 500 x g durante 7 min a 4° C. Los trofozoitos se lavaron con medio TYI-S-33 sin suero. El número de trofozoitos presente en cada cultivo se contó usando la cámara de Neubauer y un microscopio de luz. Finalmente, los trofozoitos se ajustaron a la concentración requerida en medio TYI-S-33 sin suero.

5.16. Reto de los hámsteres con trofozoitos de la cepa HM1:IMSS

Veinte días después de la última inmunización (día 40), un grupo de hámsteres fue sacrificado y el resto se retó intraportalmente con amibas virulentas, siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Tsutsumi y col., 1984). Los hámsteres se anestesiaron administrándoles intraperitonealmente 35 mg/kg de pentobarbital sódico (anesthesal Pfizer, USA). Entonces, a los animales se les practicó una incisión media longitudinal que permitió desplazar las asas intestinales hasta poder visualizar el hilio hepático. Entonces inoculamos por vía intraportal 100 µl de medio TYI-S-33 conteniendo 250 000 trofozoitos de amibas virulentas de la cepa HM1-IMSS. La hemorragia se detuvo con una pieza de gelfoam. Las asas intestinales se devolvieron a la cavidad intestinal y la pared abdominal

se cerró suturando los hámsteres con ceda 3.0. Siete días después del reto (día 47) los animales se sacrificaron y se extrajeron los hígados, los que fueron fotografiados y analizados para determinar el porcentaje de daño hepático según la expresión:

% de daño hepático = (Peso de los abscesos/ Peso total del hígado)x100.

Para realizar los estudios de sobrevivencia, después del reto los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* y se monitorearon diariamente durante 60 días. Al final del experimento, todos los animales fueron sacrificados.

5.17. Análisis de la respuesta inmune humoral mediante ELISA.

Para evaluar la respuesta inmune humoral generada en los animales inmunizados, los hámsteres se sangraron por punción del seno retro-orbital con capilares de vidrio heparinizados en los días 0, 40 y 47. La sangre se colocó en tubos de microcentrifugas de 1,5 ml (Eppendorff, USA) y se incubó a 37° C por 30 min, luego se pasó a 4° C por 1 hora para permitir la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugó en microcentrifuga durante 3 min a 7 000 rpm y el suero se recolectó en otro tubo y se guardó a -20° C hasta su uso. Para detectar los niveles de IgG específicos, las placas de ELISA fueron recubiertas con 50 µl por pozo de PBS conteniendo 1×10^4 trofozoitos amibianos (previamente inactivados por calor durante 15 min a 52 °C), o con 50 µl por pozo de una solución 0.5 mg/ml de las proteínas recombinates EhCP112 o EhADH243 en tampón de carbonato (Na_2CO_3 0.1M, NaHCO_3 0.1 M, pH 9.0), durante toda la noche a

4 °C. Transcurrido este tiempo, las placas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se incubaron con cada suero en una dilución 1:500 en leche descremada al 1% en PBS durante 16 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las placas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de hamster conjugado a peroxidasa en una dilución 1:2000 en leche al 1% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionó solución de revelado (12 ml de amortiguador de revelado, 6 mg de orthofenilendiamina (OPD) y 30 µl de H₂O₂) 50 µl/pozo y se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se detuvo con 25 µl de H₂SO₄ 2.5 M. Los resultados de la reacción colorimétrica se leyeron en un lector de ELISA (Titertek-plus) a una longitud de onda de 492 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado y todos los valores fueron normalizados con respecto al suero preinmune correspondiente.

5.18. Ensayo de linfoproliferación celular usando esplenocitos totales de hámsteres.

Para los ensayos de linfoproliferación celular los animales se sacrificaron 20 días después de la última inmunización (día 40) y los animales que recibieron el reto intraportal con trofozoitos virulentos fueron sacrificados en el día 47 del experimento (siete días después del reto). Se extrajeron los bazo en condiciones estériles y se colocaron en cajas de vidrio conteniendo 5 ml de medio RPMI-1640 completo (medio RPMI-1640 suplementado con

suero fetal bovino 10%, Penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml). Los bazos previamente envueltos en una tela de organza estéril fueron macerados. Las células se recuperaron y se centrifugaron a 504 g por 7 min a 4 °C. Desechamos el sobrenadante y la células se sometieron a un choque osmótico con 3 ml de tampón de lisis (NH₄Cl al 0.05%, NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.0) durante 3 min a temperatura ambiente. La lisis se detuvo adicionando 3 ml de medio RPMI-1640 completo e incubando en hielo. Los linfocitos se lavaron dos veces con medio RPMI-1640, se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 completo y se colocaron en hielo. La viabilidad y cantidad de los linfocitos presente en cada muestra se determinó en una dilución 1:10 con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Finalmente se ajustaron a 4 x 10⁶ linfocitos/ml en medio RPMI completo.

Posteriormente, los linfocitos se cultivaron en placas de 96 pozos con fondo plano (COSTAR; EUA), colocando 50 µl/pozo de medio RPMI-1640 completo conteniendo 2x10⁵ linfocitos de cada hámster. Las células se estimularon *in vitro* adicionando 50 µl/pozo de medio RPMI-1640 completo el cual contenía 4x10⁴ trofozoitos de la cepa HM1:IMSS previamente inactivados con calor (52 °C, 15 min); concanavalina A (5 µg/ml); las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243 (5 µg/ml) o sin estímulo como control. Las placas de cultivo se incubaron durante 72 h a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5 % y transcurrido este tiempo a cada pozo se le añadieron 20 µL de CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation

Assay (Promega, USA) y se continuó el cultivo durante 4 h en las mismas condiciones. Posteriormente se registró la absorbancia de cada pozo a 490nm con ayuda de un lector de ELISA y con estos datos se determinó el índice de estimulación para cada muestra según la expresión:

Índice de estimulación=(Absorbancia de muestra estimulada /Absorbancia de muestra sin estimular)

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

5.19. Análisis de la expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β y del gen de la enzima iNOS mediante RT-PCR en tiempo real.

Para medir la expresión de citocinas en los hámsteres, estos fueron sacrificados en los días 40 y 47 del experimento. Los hígados y bazo de estos animales se extrajeron y se congelaron a -70 °C. A partir de estas muestras congeladas se realizó una extracción de RNA total usando Trizol como se describió anteriormente.

5.19.1. Síntesis de cDNA.

Para la síntesis del cDNA mediante transcripción reversa, se colocaron en tubos individuales 5 μ g de RNA total de cada muestra, se les adicionó 1 μ l (250 ng) de un oligo(dT)₁₈ (Invitrogen) como cebador y agua-DEPC hasta un volumen final de 12 μ l. La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min, transcurrido este tiempo los tubos se incubaron en hielo por 4 min y se les adicionó 4 μ l del tampón (First Strand Buffer 5X, Invitrogen), 2 μ l de

una solución de DTT 0.1 M, 1 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM, la mezcla se homogeneizó y se incubó a 42 °C durante 2 min. Se adicionó 1 μ l (20 U) de la enzima SuperScript II (Invitrogen) y la mezcla se incubó nuevamente durante 50 min a 42 °C. Para detener la reacción, la enzima se inactivó al incubar la mezcla durante 15 min a 70 °C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se incubó a 4 °C durante 5 min, se centrifugó a 7374 g a 4 °C durante 30 s. Se adicionó 1 μ l (3U) de RNAsa H en cada tubo y se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente los cDNA obtenidos se conservaron a -70 °C hasta su uso.

5.19.2. Amplificación de los genes INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β e iNOS.

Para el análisis de la expresión de los genes de las citocinas de hámster INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β , el gen de la enzima iNOS así como para el gen constitutivo *hprt*, se realizaron PCR cuantitativas en tiempo real con el sistema ABI Prisma 7300, usando placas de reacción de 96 pozos, en las cuales se adicionó 1 μ l de cDNA y 24 μ l de una mezcla compuesta por 12.5 μ l de un master mix para PCR conteniendo SYBR green (Applied Biosystems, USA), 300 nM de cada juego de cebadores específicos (Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron un paso de desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C, 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento a T_m (Tabla 2) durante 20 s y extensión a 72 °C durante 35 s, al finalizar los 40 ciclos se adicionó otro paso de disociación para obtener las curvas de disociación. Como control se utilizó cDNA proveniente

de hámsteres sin inmunizar y sin retar. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación relativa de los niveles de expresión de cada gen fue determinada en cada muestra usando el método del $\Delta\Delta\text{CT}$ (Pfaffl, 1991). Los resultados reportados representan niveles de expresión relativos del gen analizado con respecto a los niveles de expresión en los animales controles sin inmunizar y sin retar. Los cebadores específicos para gen amplificado se muestran en la tabla 2.

5.20. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos colectados se realizó utilizando los paquetes estadísticos Statistica (Statsoft, USA) y Prism 4.0 (Graphpad, USA). Para las comparaciones entre los grupos de tratamientos se aplicó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) conbinado con la prueba de Tukey para probar las diferencias entre las medias muestrales. Diferencias estadísticas con un valor de $p < 0.05$ se consideraron significativas. La sobrevivencia fue calculada mediante el método de Kaplan-Meier y la significancia estadística fue determinada con la prueba log-rank (equivalente a la prueba Mantel-Haenzel).

Tabla 2. Cebadores específicos para la amplificación de los genes INF- γ , TNF- α , IL-4, TGF- β e iNOS, mediante PCR en tiempo real.

Cebadores	Tm (°C)	Amplicon (bp)
<i>hprt</i> sentido: 5'-AGATCCACTCCCATAACTGTAGATTTTAT-3' <i>hprt</i> antisentido: 5'-CATCCGCACCATTAATTTTAAAGTC-3'	56	91
TNF- α sentido: 5'-AACTCCAGCCGGTGCCTAT-3' TNF- α antisentido: 5'-G TTCAGCAGGCAGAAGAGGATT-3'	56	81
INF- γ sentido: 5'-GGCCATCCAGAGGAGCATAG-3' INF- γ antisentido: 5'-CCATGCTGCTGTTGAAGAAGTTAG-3'	56	68
IL-4 sentido: 5'-CCACGGAGAAAGACCTCATCTG-3' IL-4 antisentido: 5'-GGGTCACCTCATGTTGAAATAA-3'	56	72
TGF- β sentido: 5'-GCGGCAGCTGTACATCGA-3' TGF- β antisentido: 5'-GGCTCGTGAATCCACTTCCA-3'	60	57
iNOS sentido: 5'-GCAGAATGTGACCATCATGG-3' iNOS antisentido: 5'-TTCTACTACTATCAGGTCGAG-3'	49	198

6. Resultados.

6.1. Análisis de restricción de los plásmidos *pcDNA3*, *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

En la figura 2, se muestran geles de agarosa que ilustran los resultados de los análisis de restricción practicados a los plásmidos purificados para comprobar su identidad y facilitar su cuantificación mediante análisis densitométrico. En el panel A se puede apreciar la generación de una sola banda de aproximadamente 5.4 kb al digerir el plásmido *pcDNA3* con la enzima BamH I (Fig 2A, carril 1) o con la enzima EcoR I (Fig 2A, carril 4), coincidiendo con la talla teórica esperada para este plásmido linealizado. El plásmido *pcDNA-Ehcp112* al ser restringido con las enzimas BamH I (Fig 2A, carril 2) o EcoR I (Fig 2A, carril 5) produjo una banda de 6.7 kb; mientras que el plásmido *pcDNA-Ehadh112* tratado con las enzimas Xba I (Fig 2A, carril 3) y Apa I (Fig 2A, carril 6) arrojó como resultado una banda de 7.1 kb, coincidiendo con las tallas esperadas para cada plásmido.

En el panel B de la figura 2 podemos observar nuevamente que el plásmido *pcDNA-Ehcp112* digerido con la enzima BamH I produce una sola banda de 6.7 kb (Fig 2B, carril 2) mientras que la doble restricción de este plásmido con las enzimas BamH I y EcoR I produce una banda de aproximadamente 5.4 kb, que coincide con la talla esperada para el vector *pcDNA3* linealizado

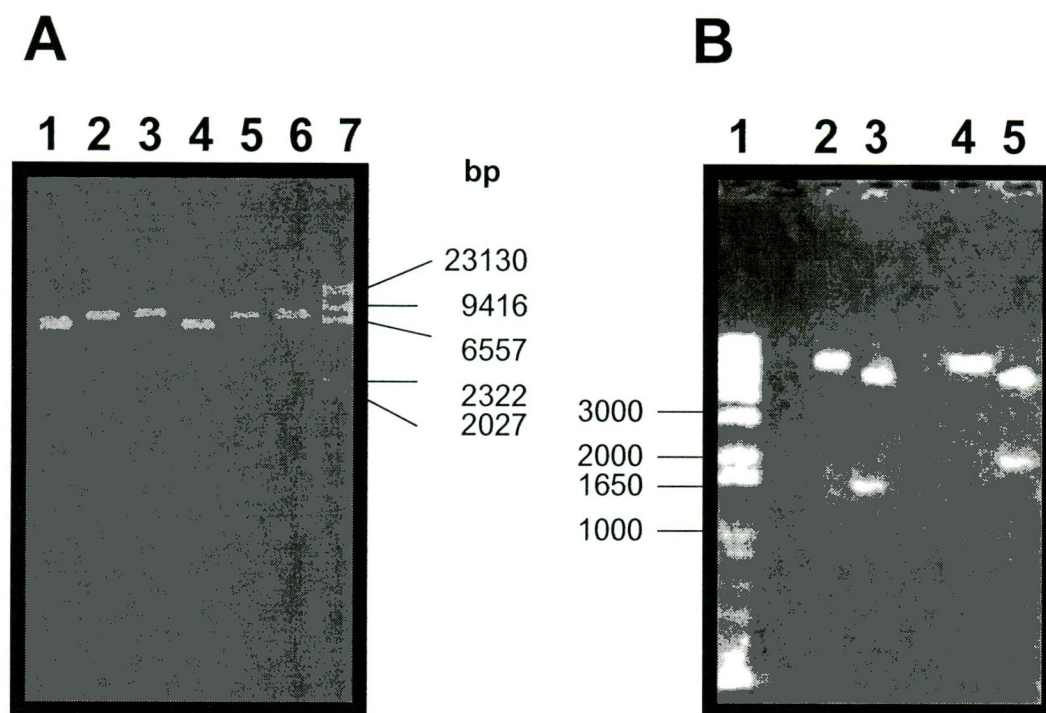


Figura 2. Análisis en gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos *pcDNA3*, *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*. El DNA plasmídico purificado a partir de las clonas transformantes de *E. coli*, fue sometido a un análisis de restricción para verificar su identidad. En el panel A se muestra el análisis realizado mediante digestión simple. Carriles: 1) plásmido *pcDNA3* linealizado con la enzima BamH I, 2) plásmido *pcDNA-Ehcp112* linealizado con la enzima BamH I 3) plásmido *pcDNA-Ehadh112* linealizado con la enzima Xba I 4) plásmido *pcDNA3* linealizado con la enzima EcoR I 5) plásmido *pcDNA-Ehcp112* linealizado con la enzima EcoR I 6) plásmido *pcDNA-Ehadh112* linealizado con la enzima Apa I 7) marcador de tamaño molecular DNA λ / Hind III. En el panel B se muestra el análisis realizado mediante doble digestión para liberar el inserto correspondiente. Carriles: 1) marcador de tamaño molecular GeneRuler DNA ladder (Fermentas) 2) plásmido *pcDNA-Ehadh112* linealizado con la enzima Apa I 3) plásmido *pcDNA-Ehadh112* sometido a doble digestión con las enzimas XbaI y Apa I 4) plásmido *pcDNA-Ehcp112* linealizado con la enzima EcoR I 5) plásmido *pcDNA-Ehcp112* sometido a doble digestión con las enzimas BamH I y EcoR I.

y un fragmento de 1.3 kb que se corresponde a la talla del gen *Ehcp112* (Fig 2B, carril 3). Mientras que la restricción del plásmido *pcDNA-Ehadh112* con la enzima Apa I produce una banda de la talla esperada para esta construcción linealizada (7.1 kb) (Fig 2B, carril 4) y la doble digestión de este plásmido con las enzimas usadas en el clonaje (Xba I/Apa I) produce dos fragmentos uno de aproximadamente 5.4 kb y otro menor de 1.7 kb coincidiendo con las tallas esperadas para el vector linealizado y el fragmento clonado del gen *Ehadh112*.

6.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243.

Para apoyar los estudios *in vitro* se expresaron y purificaron los polipéptidos recombinantes EhCP112 y EhADH243 fusionados a una etiqueta de 6 histidinas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente por Ocadiz y col. (2005) y Martínez-López y col. (2004).

La proteína recombinante EhCP112 fue purificada mediante cromatografía de afinidad con níquel a partir de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLys S transformadas con el plásmido *pTrcHisC-Ehcp112*.

En la figura 3A se presenta un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5% mostrando los extractos de bacterias antes y después de tres horas de inducción con IPTG, así como los productos de los pasos de purificación mostrándose finalmente la proteína purificada (Fig. 3A carril 5) donde se aprecian dos bandas proteicas, una mayoritaria de 52 kDa y otra menor de

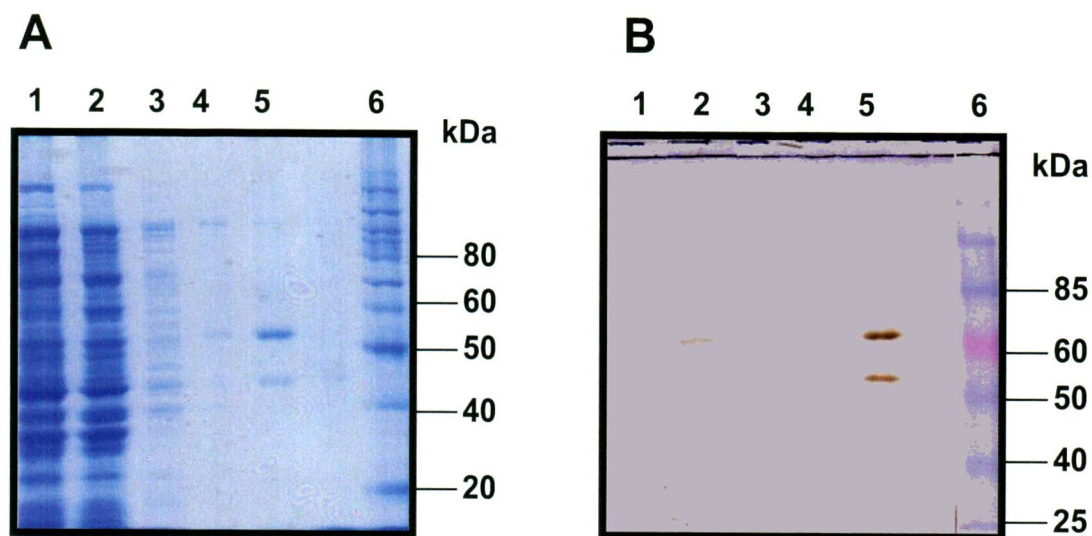


Figura 3. Expresión y purificación mediante cromatografía de afinidad de la proteína recombinante EhCP112. La expresión de la proteína EhCP112 se indujo con IPTG 1 mM, las células fueron lisadas y la proteína recombinante se purificó mediante afinidad a níquel con la resina Ni-NTA. Las muestras proteicas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 12.5% (panel A) y transferidas a membranas de nitrocelulosa para su posterior detección con el anticuerpo monoclonal anti-histidinas (panel B). Carriles: 1) extractos de *E. coli* sin inducir con IPTG, 2) extractos de *E. coli* después de 3 h de inducción con IPTG, 3-4) lavados de la columna Ni-NTA, 5) proteína EhCP112 eluida de la columna Ni-NTA, 6) marcador de peso molecular BenchMark protein ladder (Invitrogen) (panel A) o BenchMark prestained protein ladder (Invitrogen) (panel B).

47 kDa. Para confirmar la identidad de la proteína purificada se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de histidinas (Mouse Anti-His (C-term) Monoclonal Antibody, Invitrogen) (Fig. 3B), que permitió confirmar la presencia de la proteína recombinante tanto en las bacterias inducidas con IPTG como en las dos bandas correspondientes a la fracción purificada (Fig. 3B, carril 5) correspondiendo la primera al peso esperado para la proteína recombinante y la segunda posiblemente a un producto del procesamiento de esta proteasa.

Para la purificación del polipéptido EhADH243 las bacterias de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLys S fueron transformadas con el plásmido pRSETadh729. Las bacterias fueron inducidas con IPTG y el polipéptido expresado fue purificado usando una columna de afinidad Ni-NTA (QIAGEN).

En la Fig. 4A se muestra un SDS-PAGE al 12.5% mostrando al polipéptido recombinante purificado con un peso de aproximadamente 31 kDa como se esperaba y para confirmar su identidad se realizó un Western blot usando el anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de histidinas (Invitrogen) (Fig. 4B), confirmándose que efectivamente se purificó el polipéptido esperado de 31 kDa. Ambos polipéptidos purificados fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

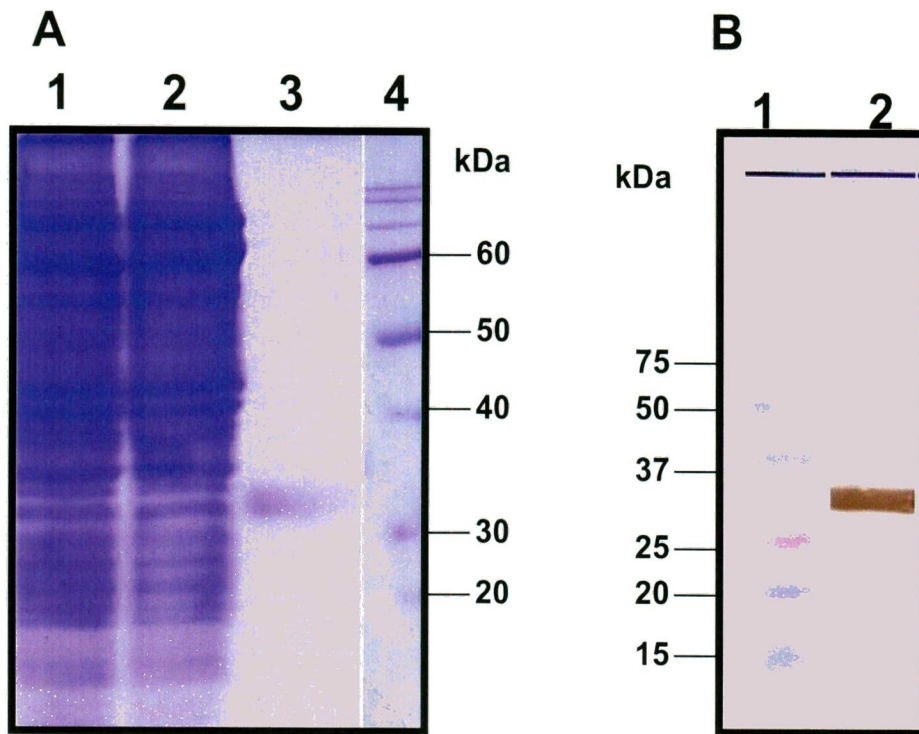


Figura 4. Expresión y purificación mediante cromatografía de afinidad de la proteína recombinante EhADH243. La expresión de la proteína EhADH243 se indujo con IPTG 1 mM, las células fueron lisadas y la proteína recombinante se purificó mediante afinidad a níquel con la resina Ni-NTA. Las muestras proteicas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 12.5% (panel A) Carriles: 1) extractos de *E. coli* sin inducir con IPTG, 2) extractos de *E. coli* después de 3 h de inducción con IPTG, 3) proteína EhADH243 eluida de la columna Ni-NTA, 4) marcador de peso molecular BenchMark protein ladder (Invitrogen). La proteína purificada fue trasferida a una membranas de nitrocelulosa para su posterior detección con el anticuerpo monoclonal anti-histidinas (panel B) Carriles: 1) marcador de peso molecular BenchMark prestained protein ladder (Invitrogen), 2) proteína EhADH243.

6.3. Expresión *in vivo* de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* después de la inmunización de hámsteres con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

La inmunización de hámsteres con una mezcla de plásmidos que codifica para los polipéptidos EhCP112 y EhADH112 de *E. histolytica* induce una protección parcial contra la formación del absceso hepático (Madriz y Col., 2004). Sin embargo, para conocer como se expresaban estos polipéptidos en los diferentes órganos de los animales inmunizados, estudiamos el patrón de expresión de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en grupo de hámsteres inoculados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* por las vías intramuscular e intradérmica, usando como control animales inmunizados de igual manera con el vector *pcDNA3*. Los hámsteres fueron sacrificados a las 18 h, a los 7 días y a los 21 días después de la inoculación de la mezcla de plásmidos para evaluar la expresión de los genes mediante RT-PCR en tiempo real en piel, músculo, bazo e hígado. Los resultados obtenidos mostraron una expresión diferencial de estos genes en los diferentes tejidos estudiados y en los animales inoculados por las dos rutas antes descritas (Fig 5). Después de la administración de la mezcla de plásmidos por la ruta intradérmica, no se detecto la presencia del RNAm de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en la piel. Sin embargo, ambos genes fueron expresados en el bazo y el hígado durante todos los tiempos analizados. La cantidad del RNAm del gen

Ehcp112 detectada en el bazo a las 18 h fue considerada como el 100% (Fig 5A) y esta cantidad fue ligeramente superior a la encontrada en hígado (73%) en ese mismo tiempo. Este gen alcanza su máxima expresión el día siete en el bazo (171%) para después disminuir su expresión en este órgano en el día 21 aún 25% del valor obtenido a las 18 h (Fig 5A). En el hígado, este gen disminuyó su expresión a un 25% en el día siete y a un 12.5% en el día 21 después de la inoculación (Fig 5A).

En el bazo, a las 18 h la cantidad del RNAm del gen *Ehadh112* fue ligeramente mayor (120%) a la cantidad correspondiente para el gen *Ehcp112*, pero su cantidad disminuye a 89% en el día siete y a 31% en el día 21 posteriores a la inoculación (Fig 5B).

En los hámsteres inoculados por la vía intramuscular, se pudo detectar una cantidad similar del transcrito del gen *Ehcp112* en el músculo, el bazo y el hígado (132-150%) en todos los tiempos estudiados (Fig 5C), excepto en el hígado a los 21 días donde el RNAm disminuye a 68% (Fig 5C). En estos animales intramuscularmente vacunados, la cantidad de RNAm del gen *Ehadh112* a las 18 h fue superior en el bazo (187%) con respecto a la cantidad encontrada en el músculo (50%), mientras que en el hígado casi no hubo expresión (3%) (Fig 5D). Sin embargo, en el día siete después de la inoculación, la cantidad de mensajero del gen *Ehadh112* aumentó en el músculo (119%) y en el hígado (110%), pero disminuyó ligeramente en el bazo (163%) con respecto a la cantidad detectada a las 18 h (Fig 5D). Interesantemente, en el día 21 después de la inoculación el RNAm del gen

Ehadh112 fue pobremente detectado en los tres tejidos (0-4%) (Fig 5D). No se detecto la presencia de RNAm de ninguno de los dos genes en las muestras obtenidas de los hámsteres inoculados con *pcDNA3* por la ruta intradérmica o intramuscular (Fig 5).

6.4. Expresión *in vivo* de las proteínas EhCP112 and EhADH112 después de la inmunización de hámsteres con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Para confirmar la expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en la piel, en el músculo, en el bazo y en el hígado de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos por la ruta intruscular o intradérmica desarrollamos tinciones inmunohistoquímicas empleando anticuerpos específicos contra cada una de ellas.

En los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica, se pudo comprobar la expresión de ambas proteínas en algunos linfocitos y en numerosos macrófagos, así como en los hepatocitos (Fig 6A, B, C) en los tres intervalos de tiempo estudiados. A pesar de lo anterior se puede apreciar una baja expresión de la proteína EhCP112 en el hígado de los animales sacrificados 21 días después de la inoculación (Fig 6C). En contraste no se encontró expresión de ninguna de las dos proteínas en el sitio de inoculación en ninguno de los tres intervalos de tiempos estudiados (Fig 6A, B, C).

En los hámsteres vacunados intramuscularmente se aprecia la expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en los macrófagos esplénicos

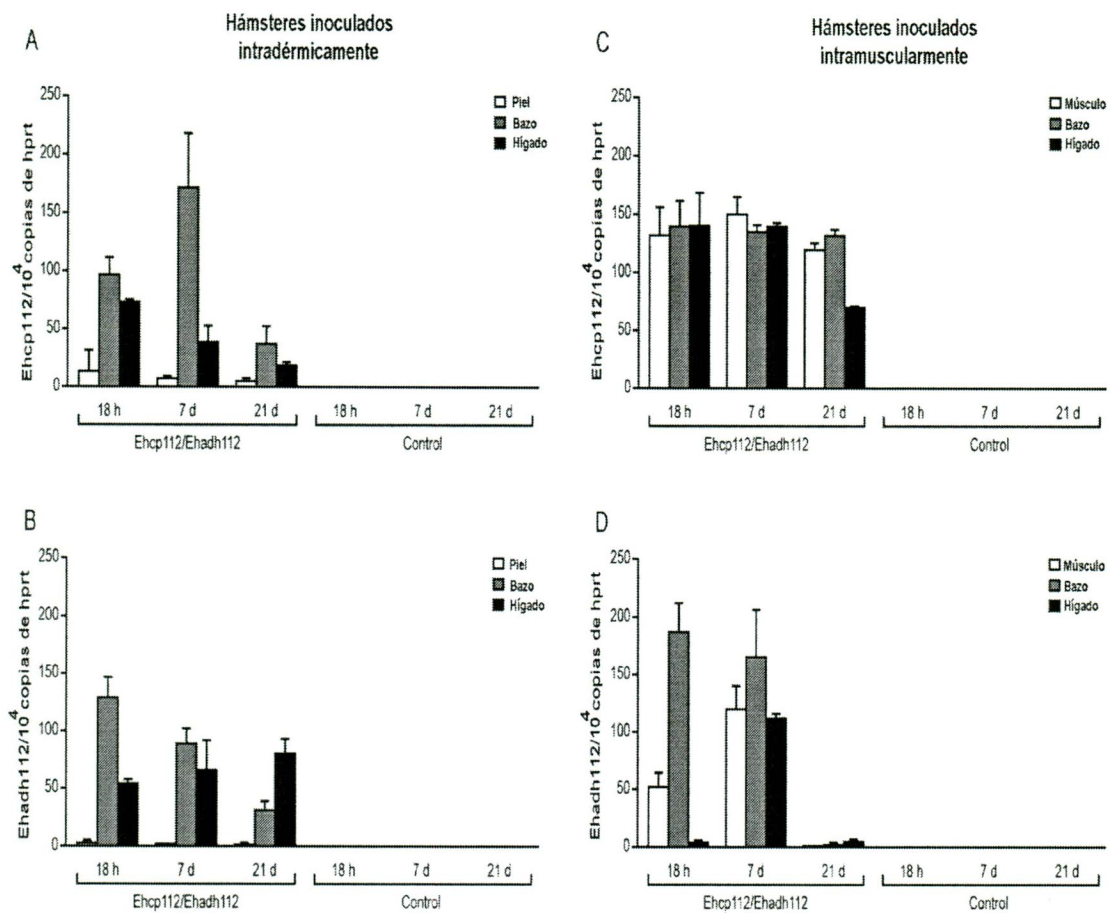


Figura 5. Expresión de RNAm de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112* en los hámsteres inmunizados. La expresión del RNAm de los transgenes fue analizada usando cantidades equivalentes de RNA total aislado a partir de diferentes tejidos de los hámsteres a las 18h, 7 días y 21 días después de la inoculación intradérmica (A, B) o intramuscular (C, D) con la mezcla de plásmidos o con *pcDNA3* como control. El RNA total (5 µg) aislado de la piel, el músculo, el bazo o el hígado y tratado con DNasa I, fue sometido a RT-PCR en tiempo real usando cebadores específicos.

(Fig 6E, F, G), excepto en el día 21 donde no se aprecia la expresión de la proteína EhADH112 (Fig 6G). Se detectó la expresión de la proteína EhCP112 en los hepatocitos de los animales estudiados en los tres tiempos analizados (Fig 6E, F, G), mientras que la proteína EhADH112 no fue detectada en este órgano a las 18 h (Fig 2E). A los 7 días después de la inoculación de la mezcla de plásmidos se pudo apreciar la expresión de la proteína EhADH112 en los hepatocitos (Fig 6F), pero su expresión desapareció al analizar las muestras de hígados a los 21 días posteriores a la inoculación de la mezcla plasmídica (Fig 6G). Ambas proteínas fueron detectadas en el sitio de inoculación (músculo anterior de la tibia) en los tres tiempos estudiados, excepto a los 21 días, donde no se detectó expresión de la proteína EhADH112 en el músculo de los animales inoculados con la mezcla plasmídica (Fig 6E, F, G).

Los animales usados como control y que fueron inoculados con el vector *pcDNA3* por la ruta intradérmica o intramuscular no expresaron ninguna de las dos proteínas en el bazo, el hígado ni tampoco en el sitio de inoculación (Fig 6D, H).

6.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral específica antes del reto en hámsteres inoculados con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Para determinar si la inoculación con la mezcla de los plásmidos estimuló la producción de anticuerpos específicos contra las proteínas amibianas EhCP112 o EhADH112 desarrollamos ensayos de ELISA utilizando los

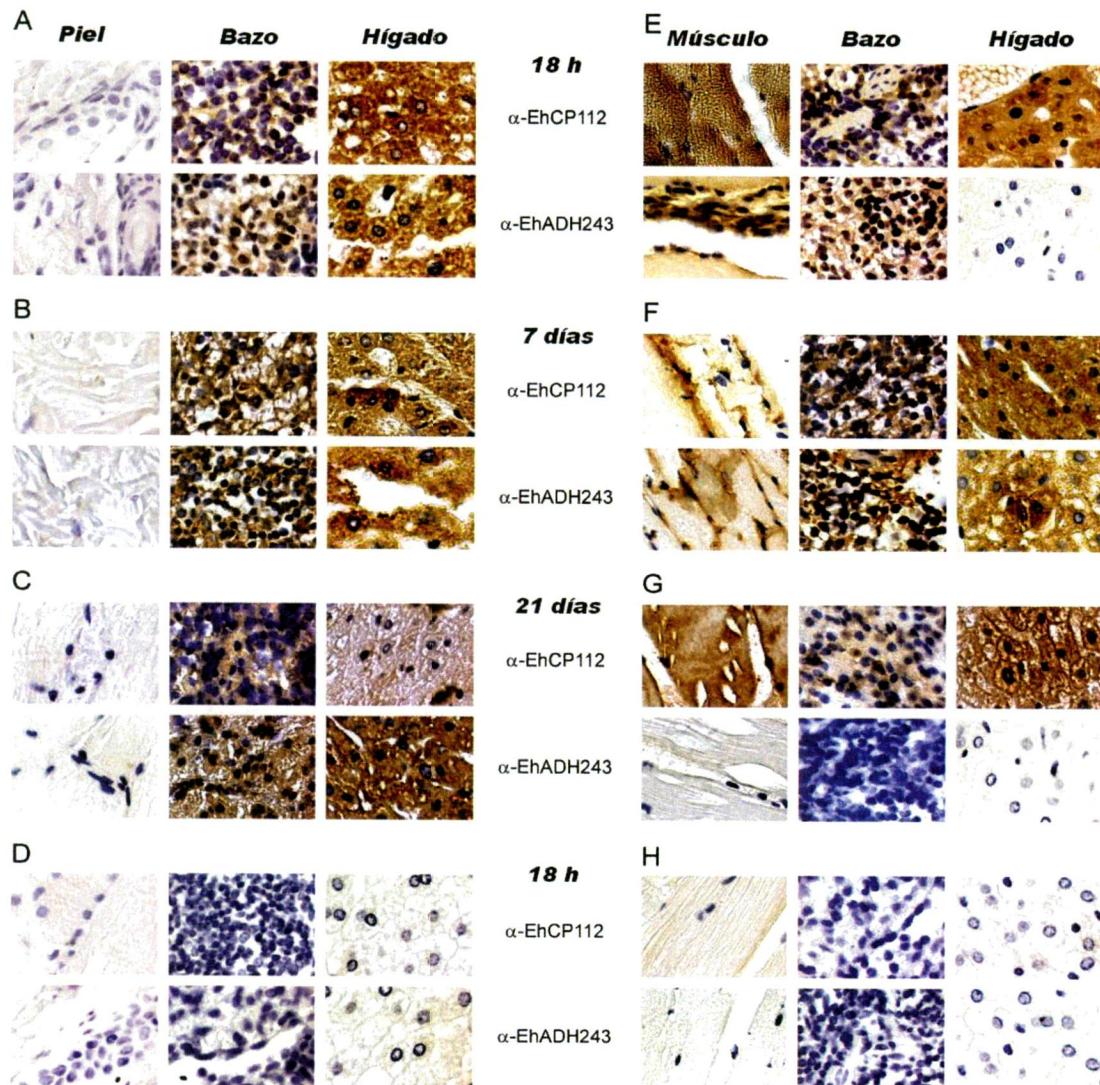


Fig. 6. Expresión *in vivo* de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en los tejidos de los hámsteres inmunizados con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*. La expresión de las proteínas fue analizada mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales específicos en los tejidos de los hámsteres inmunizados intradérmicamente (A-D) o intramuscularmente (E-H). Se muestran fotos representativas del patrón de expresión de las proteínas a las 18 h (A, E), 7 días (B, F) y 21 días (C, G) posteriores a la inoculación del DNA. También se muestran fotos representativas de tejidos procedentes de los hámsteres controles inoculados con el plásmido *pcDNA3* (D, H). Aumento 40x.

sueros colectados al día 40 después de la primera inmunización. Las placas de ELISA fueron recubiertas con las proteínas recombinantes EhCP112 o EhADH243 o con trofozoitos amibianos inactivados con calor. El resultado obtenido para el suero preinmune (suero del día 0) fue sustraído del valor resultante obtenido en cada animal inmunizado. Los resultados finales obtenidos para cada ruta de inoculación se muestran en la figura 7. Los hámsteres vacunados por la ruta intradérmica produjeron muy bajos niveles de anticuerpos IgG epecíficos en el día 40 (después de haber recibido dos inmunizaciones con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*) (Fig 7A). Un patrón similar de anticuerpos fue observado en los hámsteres vacunados por la ruta intramuscular mostrando bajos niveles de anticuerpos IgG específicos al día 40, pero en estos animales, se aprecia un ligero incremento en los niveles de anticuerpos determinados al recubrir las placas de ELISA con la proteína recombinante EhADH243, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre los sueros de los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos y los animales controles inmunizados con el vector *pcDNA3* (Fig 7B). Estos resultados pudieran ser consecuencia de una baja estimulación de células T auxiliaoras, por esta razón decidimos evaluar la respuesta inmune celular en estos animales.

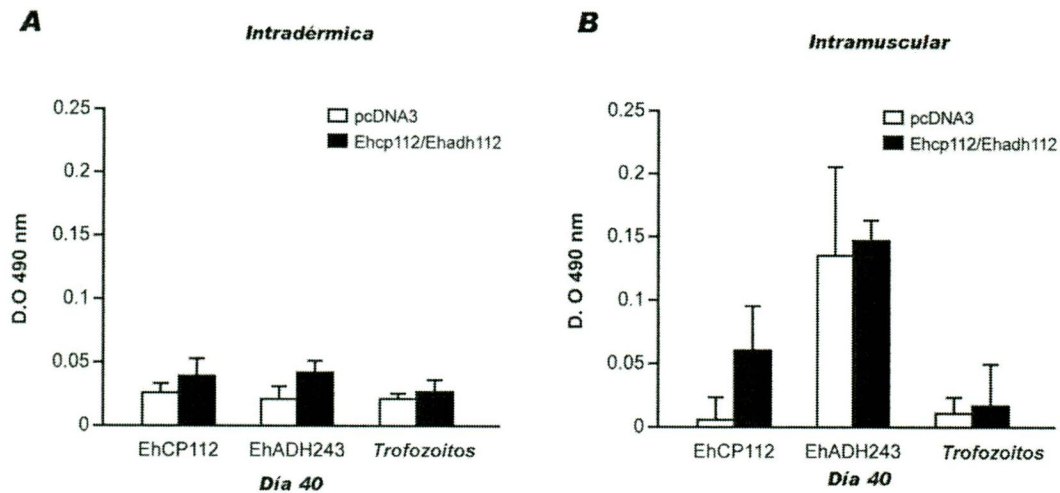


Figura 7. Respuesta inmune humoral de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos. Los hámsteres fueron inmunizados por la ruta intradérmica (A) o intramuscular (B) con el vector *pcDNA3* o con una mezcla de plásmidos que codifican las proteínas EhCP112 y EhADH112. Cuarenta días después se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243 o contra trofozoitos amibianos inactivados con calor, presentes en los sueros diluidos 1:500, usando la técnica de ELISA. Las barras representan el promedio de las densidades ópticas de cada grupo de hámster (n=8) a 490 nm, con sus respectivas desviaciones estándar para los sueros analizados. En todos los casos los valores fueron normalizados con respecto al valor del suero pre-inmune (día 0).

6.6. Respuesta inmune celular inducida en los hámsteres inmunizados con la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

En este trabajo evaluamos la respuesta inmune celular inducida en los animales que recibieron dos inoculaciones, por la vía intradérmica o intramuscular, con la mezcla de plásmidos codificando los antígenos amibianos EhCP112 y EhADH112 o con el vector *pcDNA3* como control.

En el día 40, los animales inoculados con la mezcla de plásmidos por la ruta intradérmica mostraron un incremento de sus niveles de proliferación celular con respecto al grupo control al estimular *in vitro* sus esplenocitos con trofozoitos amibianos inactivados con calor o con las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243 (Fig 8A). Los análisis estadísticos mostraron, que las diferencias observadas en los niveles de proliferación de los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos con respecto a los controles inmunizados con el vector *pcDNA3* fueron estadísticamente significativas cuando se estimularon *in vitro* con las proteínas recombinantes EhCP112 ($p < 0.05$) y EhADH243 ($p < 0.05$) o con trofozoitos inactivados con calor ($p < 0.01$). Los esplenocitos de los animales inmunizados con *pcDNA3* no mostraron diferencias en los niveles de proliferación celular frente a los diferentes estímulos usados (Fig 8A).

Por el contrario, los esplenocitos de los animales inmunizados por la ruta intramuscular con la mezcla plasmídica, presentaron bajos niveles de proliferación celular independientemente del estímulo utilizado y no se detectaron diferencias entre las células provenientes de los animales

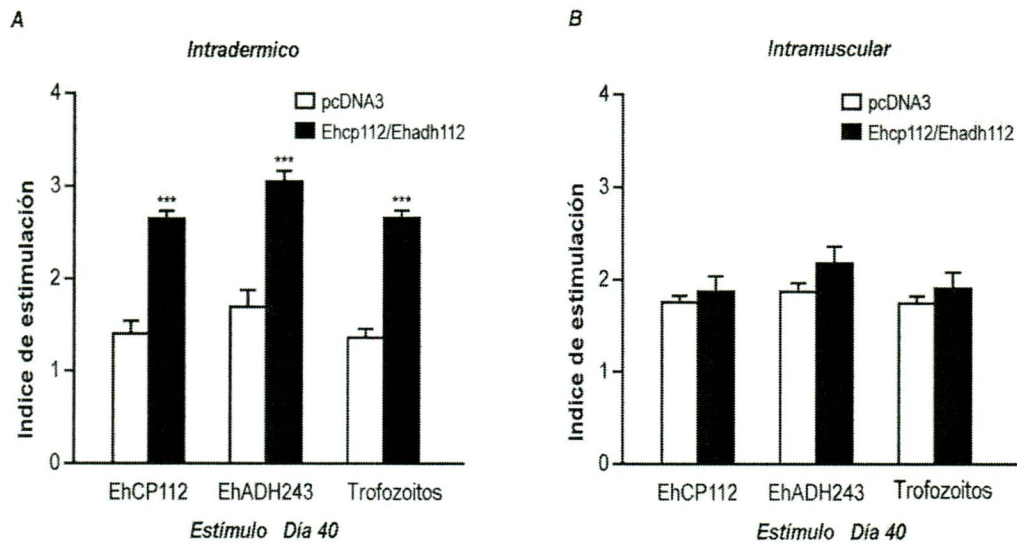


Figura 8. Respuesta linfoproliferativa a partir de células esplénicas totales de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112*. Los hámsteres fueron inoculados dos veces con un intervalos de 20 días usando una mezcla que contenía 100 µg de cada plásmido y 20 días después de la última inoculación un grupo de estos animales fueron sacrificados (día 40 del experimento) y los esplenocitos de cada uno de ellos fueron estimulados *in vitro* con las proteínas recombinantes EhCP112, EhADH243 o con trofozoitos amibianos inactivados con calor. El grado de proliferación celular frente a cada estímulo fue medido con el kit colorimétrico CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Las barras representan el valor promedio de los índices de estimulación de las células provenientes de los hámsteres de un mismo grupo (n=8) frente a un estímulo en particular con respecto a las mismas células no estimuladas y las líneas sus respectivas desviaciones estándares. Grupos de hámsteres (n=8) inmunizados con 200 µg del vector *pcDNA3* se usaron como control.

inoculados con la mezcla plasmídica y las provenientes de los animales controles (Fig 8B).

6.7. Evaluación del patrón de citocinas en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.

El patrón de citocinas asociado con la respuesta inmune celular inducida en los hámsteres inoculados por la ruta intradérmica o intramuscular fue evaluado en el día 40 usando RT-PCR en tiempo real.

En las células esplénicas de los hámsteres vacunados intradermicamente vacunados con la mezcla de los plásmidos, se detectaron incrementos de las citocinas proinflamatorias INF- γ y TNF- α en el orden de 9 a 10 veces respectivamente con respecto a los animales no inmunizados, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células de los hámsteres vacunados con el vector *pcDNA3* (Fig 9A). La citocina de tipo Th2 IL-4 mostró un incremento de 7 veces con respecto a los animales no inoculados y más de dos veces con respecto los animales que fueron inoculados con el vector *pcDNA3* (Fig 9A), mientras que la citocina TGF- β manifestó un incremento más discreto de 2 veces en el bazo de los hámsteres inmunizados con la mezcla con respecto a los controles no inmunizados (Fig 9A). El análisis estadístico arrojó que no hay diferencias significativas para ninguna de las citocinas estudiadas entre el grupo inmunizado con la mezcla de plásmidos y los vacunados con el vector *pcDNA3* ($p > 0.05$) (Fig 9A). En el bazo de los animales inoculados con la

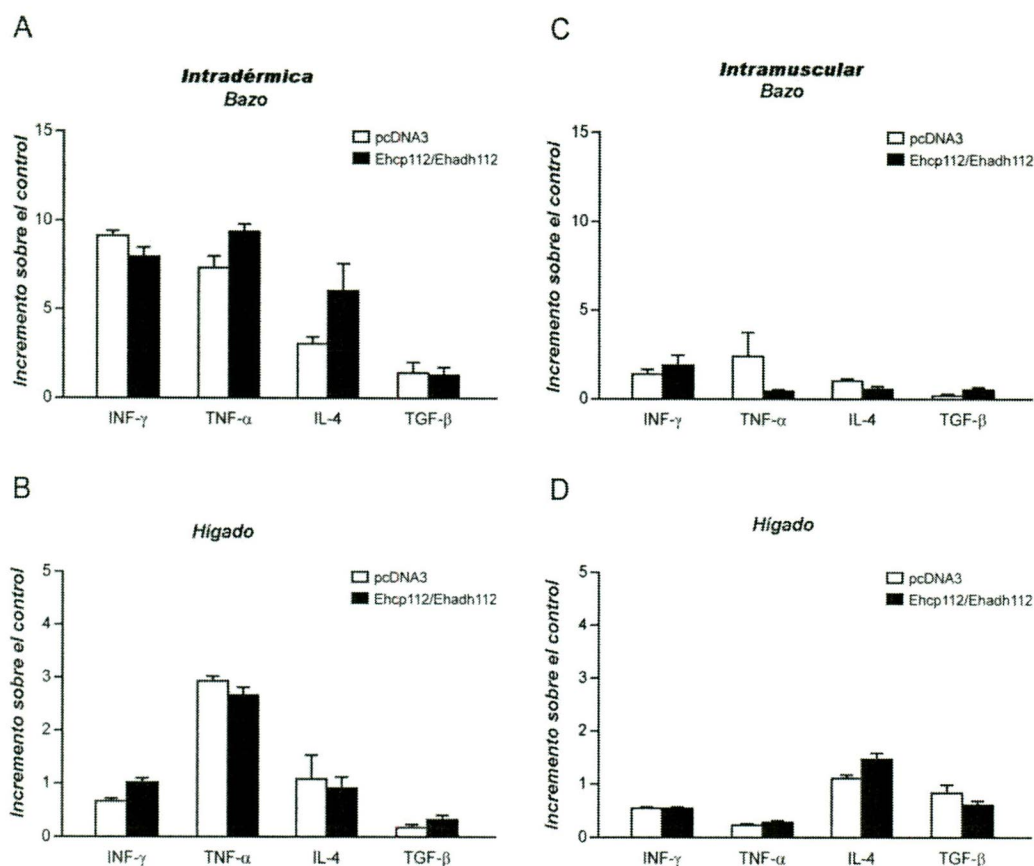


Fig. 9. Niveles de expresión de RNAm de las citocinas en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112*. El RNA total fue extraído a partir de bazos e hígados de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos o con *pcDNA3* como control y sacrificados en el día 40. Los niveles de expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β fueron cuantificadas a partir de 5 μ g de RNA total mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados expresan la diferencia entre los valores de Δ CT de la muestra analizada y el comparador (hámsteres no inmunizados). Cada barra representa la media de los valores de cada grupo (n= 8) con sus respectivas desviaciones estándares. Se muestran los niveles de expresión del RNAm de las citocinas en el bazo e hígado de los hámsteres inmunizados intradérmicamente (A y B) o intramuscularmente (C y D).

mezcla plasmídica por la ruta intramuscular se observó un pequeño incremento de las citocinas estudiadas que no supera las 3 veces con respecto a los niveles de presente en los animales no inmunizados y tampoco se encontró diferencias significativas con los niveles presentes en el bazo de los animales inoculados con el vector *pcDNA3* (Fig 9C).

Cuando se analizó los niveles de expresión de estas citocinas en el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica, se pudo apreciar que los niveles de expresión fueron menores que los encontrados en el bazo (Fig 9A, B) y aunque se manifiesta un incremento en la expresión de TNF- α con respecto a las otras citocinas, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ninguna de ellas entre el grupo que recibió la combinación de los plásmidos y el que recibió el plásmido *pcDNA3* (Fig 9B). En el hígado de los animales inoculados intramuscularmente se detectaron niveles de expresión muy bajos para las cuatro citocinas estudiadas que estuvieron por debajo de dos veces con respecto a los niveles presentes en los animales sin inmunizar (Fig 9D).

6.8. Daño hepático producido por los trofozoitos virulentos de *E. histolytica* en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.

Para probar la capacidad de la inoculación de la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112/ pcDNA-Ehadh112* para proteger a los hámsteres contra la formación de AHA y el efecto de la ruta de inoculación en la protección

hepática, los hámsteres fueron retados mediante la inoculación intraportal de 250 000 trofozoitos virulentos de la cepa HM1:IMSS y siete días después del reto los animales fueron sacrificados y analizamos el porcentaje de hígado dañado en cada animal.

Los resultados obtenidos mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los animales inmunizados con *pcDNA3* y los inmunizados con la mezcla de plásmidos por la ruta intradérmica ($p= 0.0012$) (Fig 10A). Tres de los ocho hámsteres analizados no presentaron daño hepático, mientras que los restantes cinco animales presentaron áreas con abscesos pequeños y bien localizados como se ilustra en la figura 10B. Todos los hámsteres inmunizados con el plásmido *pcDNA3* mostraron extensas áreas de absceso hepático (Fig 10B).

Por el contrario en los hámsteres inmunizados por la ruta intramuscular no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de daño hepático en el grupo inmunizado con el vector *pcDNA3* y los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos (Fig 10C). Todos los animales inoculados por esta ruta mostraron abscesos hepáticos extensos y muy similares en los dos grupos analizados (Fig 10D).

Los hámsteres vacunados con la mezcla de plásmidos por la ruta intradérmica también desarrollaron menores abscesos que los vacunados con el mismo inmunógeno por la ruta intramuscular ($p=0.003$), mientras que los animales controles vacunados con el vector *pcDNA3* no mostraron

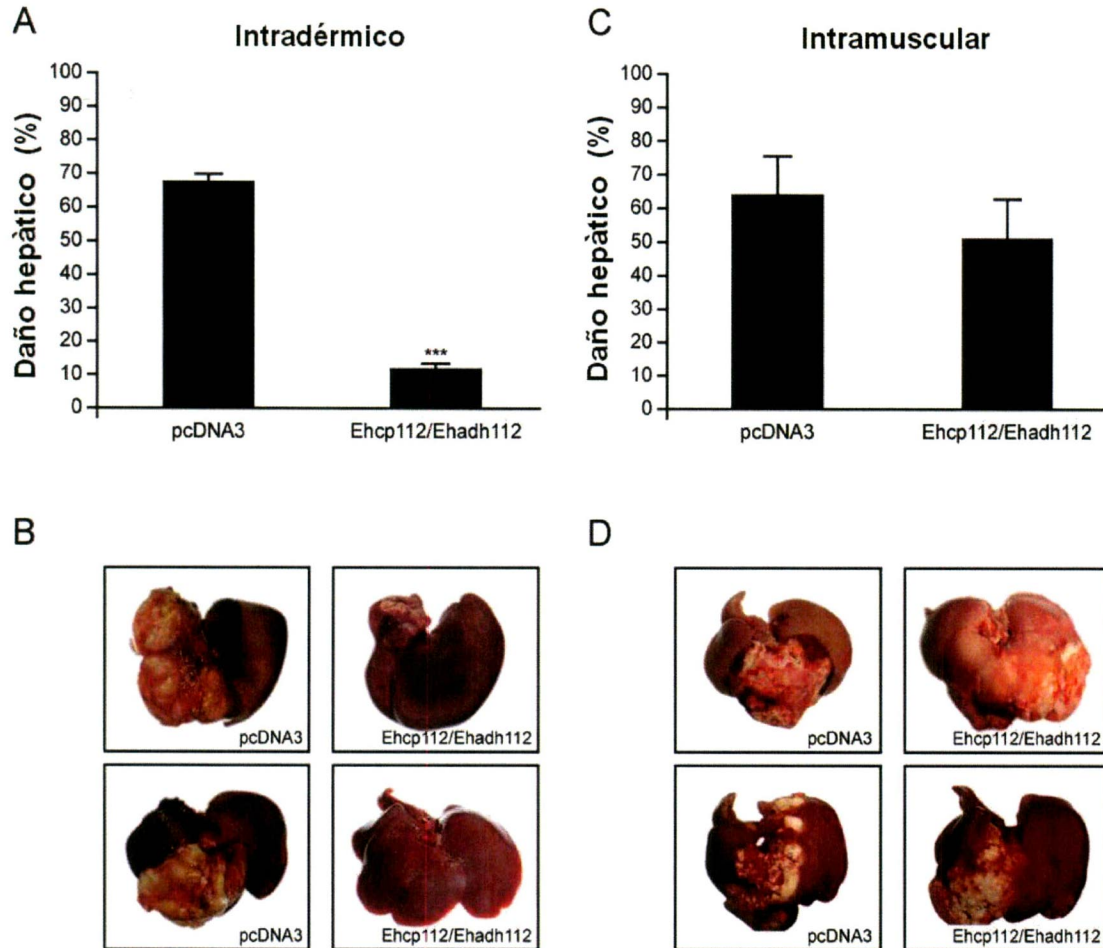


Figura 10. Daño hepático en los hámsteres siete días después del reto con trofozoitos amebianos virulentos. Se evaluó el daño hepático calculando el porcentaje de hígado dañado con respecto al peso total del órgano. Los datos representan el daño hepático promedio por grupo (n=8) de los animales inmunizados por la ruta intradérmica (A) o intramuscular (B) con sus respectivas desviaciones estándar. Los asteriscos indican una disminución estadísticamente significativa en el daño hepático con respecto al grupo control inoculado con *pcDNA3* ($p < 0.001$). En la parte inferior se presentan fotografías que ilustran los hígados de los hámsteres vacunados con el vector *pcDNA3* o con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112/pcDNA-Ehadh112* por la ruta intradérmica (C) o la ruta intramuscular (D) a los siete días después del reto intraportal con trofozoitos virulentos.

diferencias significativas independientemente de la ruta de inoculación utilizada.

6.9. Sobrevivencia de los animales inoculados por la ruta intradérmica o intramuscular con la vacuna *pcDNA-Ehcpadh* después de un reto con trofozoitos amibianos virulentos.

La protección generada por la mezcla de plásmidos frente a la formación de abscesos hepáticos amibianos, fue también estudiada evaluando la sobrevivencia de los animales vacunados después de un reto intraportal con trofozoitos virulentos de la cepa HM1:IMSS. Los resultados obtenidos mostraron que los hámstres vacunados por la ruta intradérmica con la mezcla de plásmidos tuvieron un incremento estadísticamente significativo en su sobrevivencia con respecto a los animales controles vacunados con *pcDNA3* o sin inmunizar ($p < 0.0001$) (Fig 11A). A los 60 días después del reto, tiempo en que se finalizó el experimento, el 60% de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos por la ruta intradérmica permanecieron vivos.

En los hámstres inmunizados por la ruta intramuscular también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia de los animales vacunados con la mezcla de plásmidos y los controles vacunados con *pcDNA3* o sin vacunar ($p < 0.0001$), pero solamente el 30% de los animales vacunados con la mezcla de plásmidos sobrevivieron al final del experimento (Fig 11B).

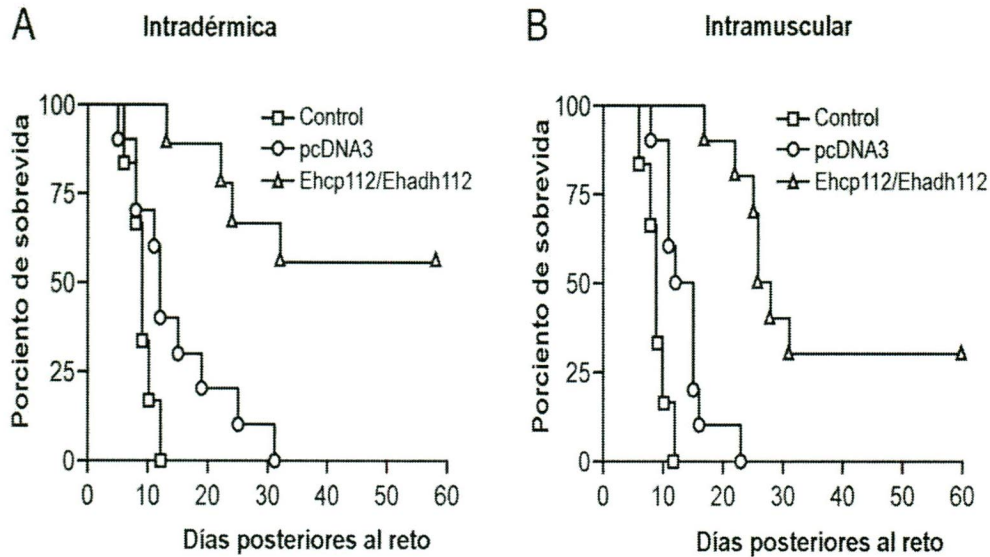


Figura 11. Sobrevida de los hámsteres después del reto con trofozoitos amibianos virulentos. Cada grupo de hámsteres (n=10) fue inmunizado en el día 0 y 20 con una mezcla de los plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112 (100/100 μ g) o con 200 μ g del vector *pcDNA3* como control, por la vía intradérmica (A) o por la vía intramuscular (B). Se incluyó también como control un grupo de animales sin inmunizar (n=10). Transcurridos 20 días después de la segunda inmunización, los hámsteres fueron retados mediante la inoculación de 250 000 trofozoitos de la cepa HM1:IMSS por vía intraportal. Después del reto la sobrevivencia de los animales fue monitoreada diariamente durante 60 días y graficada según el método de Kaplan-Meier.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de los animales sin inmunizar y los inmunizados con *pcDNA3* por la ruta intradérmica ($p=0.02$) (Fig 11A) e intramuscular ($p= 0.0047$) (Fig 11B), lo que sugiere que el vector induce cierta resistencia frente al reto intraportal con trofozoitos virulentos, aunque esta no es suficiente para generar una protección, ya que el reto intraportal le produce la muerte a todos los animales vacunados con *pcDNA3* en 30 días.

Interesantemente, todos los animales inoculados por la ruta intramuscular o intradérmica que sobrevivieron al final del experimento, presentaron sus hígados totalmente sanos.

6.10. Respuesta inmune humoral después del reto con trofozoitos virulentos en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.

Para evaluar el efecto de la inoculación de trofozoitos amibianos virulentos sobre la respuesta inmune humoral de los animales intradérmicamente o intramuscularmente vacunados, se colectaron muestras de suero en el día 7 después del reto intraportal (día 47, justo antes del sacrificio de los hámsteres) y cuantificamos los niveles de anticuerpos IgG específicos mediante la técnica de ELISA.

Los resultados obtenidos con los sueros de los hámsteres inoculados intradérmicamente, mostraron que aunque en el día 47 los niveles de anticuerpos específicos contra las proteínas recombinantes continúan siendo bajos, se aprecia un ligero incremento de 4.1 veces para las IgG

anti-EhCP112 y de 4.5 veces para las IgG anti-EhADH243 con respecto a los niveles de anticuerpos detectados en el día 40 (antes del reto). Sin embargo, estos mismos sueros del día 47 mostraron una fuerte reactividad frente a los trofozoitos amibianos inactivados con calor, manifestando un incremento de 13 veces con respecto a los niveles detectados en el día 40 frente a este mismo antígeno. A pesar de esto, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas, en los niveles de anticuerpos presentes en los hámsteres inoculados con la mezcla de plásmidos y los controles que recibieron el vector *pcDNA3* frente a ninguno de los tres antígenos usados en los ensayos de ELISA (Fig 12A).

El suero de los animales inoculados intramuscularmente, mostraron un incremento menor en el día 47, para las IgG anti-EhCP112 (2.2 veces), mientras que las IgG anti-EhADH243 permanecieron en niveles similares a los detectados en el día 40. Frente a los trofozoitos amibianos los sueros mostraron un incremento de 10.6 veces si lo comparamos con los niveles de anticuerpos en el día 40. Sin embargo, los niveles de anticuerpos en los animales inoculados con *pcDNA3* fueron similares a los obtenidos con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, frente a los tres antígenos usados (Fig 12B).

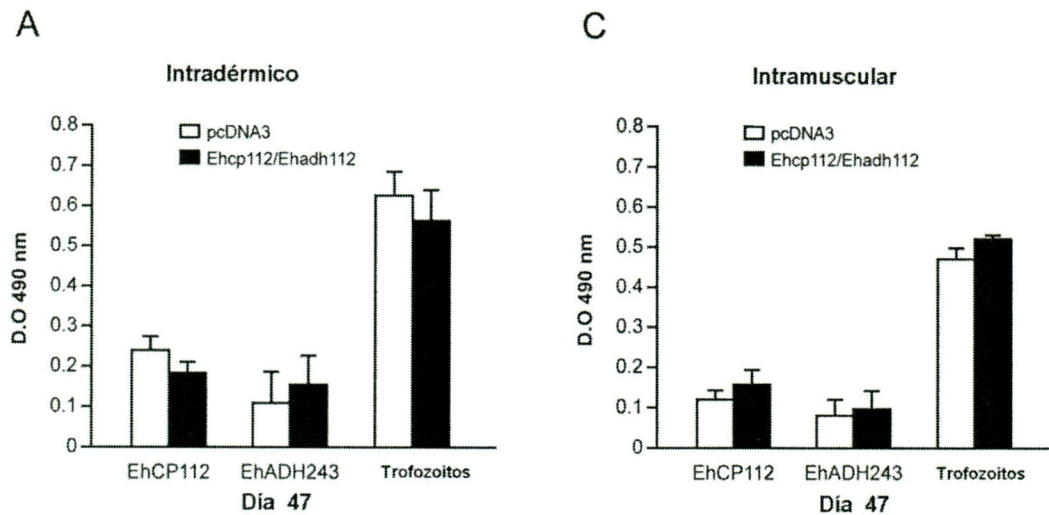


Figura 12. Respuesta inmune humoral de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos y retados con trofozoitos virulentos. Los hámsteres fueron inmunizados por la ruta intradérmica (A) o intramuscular (B) con el vector *pcDNA3* o con una mezcla de plásmidos que codifican las proteínas EhCP112 y EhADH112 administrando dos dosis cada 20 días y 20 días después de la segunda dosis fueron retados intraportalmente con trofozoitos virulentos. Siete días después del reto, se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243 o contra trofozoitos amibianos inactivados con calor, presentes en los sueros diluidos 1:500, usando la técnica de ELISA. Las barras representan el promedio de las densidades ópticas de cada grupo de hámster (n=8) a 490 nm, con sus respectivas desviaciones estándar para los sueros analizados en el día 47 (siete días después del reto). En todos los casos los valores fueron normalizados con respecto al valor del suero pre-inmune (día 0).

6.11. Respuesta inmune celular después del reto con trofozoitos virulentos en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune celular después del reto en los hámsteres vacunados y retados, los animales fueron sacrificados el día 47 (siete días después del reto intraportal) y las células esplénicas de cada animal fueron estimuladas *in vitro* con las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH243 o con trofozoitos amibianos previamente inactivados con calor.

Los resultados mostraron que en el día 47, los hámsteres inoculados intradérmicamente con la mezcla de plásmidos, mostraron un incremento significativo en sus niveles de proliferación celular (Fig 13A), los cuales fueron incluso entre 2 y 4 veces superior a los detectados frente a los mismos estímulos en el día 40 (antes del reto intraportal) (Fig 8A). Sorprendentemente, el índice de estimulación de las células esplénicas provenientes de los animales inmunizados con la mezcla de plásmidos fue mayor cuando se usó como estímulo la proteína recombinante EhADH243 que cuando usamos la proteína recombinante EhCP112 ($p < 0.001$), y el obtenido con esta última proteína recombinante también fue significativamente mayor que el obtenido al estimular *in vitro* con trofozoitos amibianos ($p = 0.027$) (Fig 13A). Con los tres estímulos usados se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de proliferación celular de los linfocitos provenientes de los animales

inmunizados con la mezcla de plásmidos y los que se inocularon con el vector *pcDNA3* (Fig 13A). Los animales inoculados intradérmicamente con el vector *pcDNA3* mostraron bajos niveles de proliferación celular, y no mostraron diferencias en los índices de estimulación frente a los diferentes estímulos usados (Fig 13A).

Por el contrario, las células esplénicas de los hámsteres inmunizados intramuscularmente, presentaron niveles muy bajos de linfoproliferación celular, aunque la estimulación *in vitro* con los trofozoitos produce un ligero incremento de la proliferación celular (Fig 13 B). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los índices de estimulación de las células esplénicas provenientes de los animales inoculados con la mezcla plasmídica y las provenientes de los animales controles inoculados con el vector *pcDNA3*.

6.12. Evaluación del patrón de citocinas en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular después del reto.

También analizamos el perfil de expresión del RNAm de diferentes citocinas en el bazo y en el hígado proveniente de los hámsteres que recibieron dos inoculaciones de DNA y posteriormente fueron retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos, usando la técnica de PCR en tiempo real.

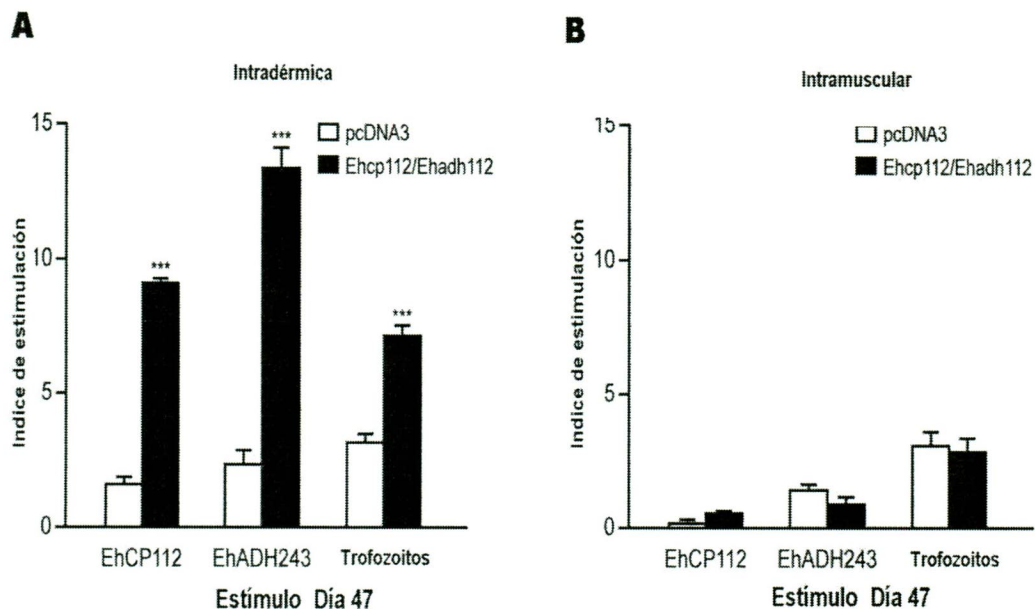


Figura 13. Respuesta linfoproliferativa después del reto, a partir de células esplénicas totales de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112*. Los hámsteres fueron inoculados dos veces con un intervalos de 20 días usando una mezcla que contenía 100 µg de cada plásmido y 20 días después de la última inoculación un grupo de estos animales fue retado por vía intraportal con trofozoitos amibianos virulentos. Grupos de animales fueron sacrificados en el día 47 del experimento y los esplenocitos de cada uno de ellos fueron estimulados *in vitro* con las proteínas recombinantes EhCP112, EhADH243 o con trofozoitos amibianos inactivados con calor. El grado de proliferación celular frente a cada estímulo fue medido con el kit colorimétrico CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Las barras representan el valor promedio de los índices de estimulación de las células provenientes de los hámsteres de un mismo grupo (n=8) frente a un estímulo en particular con respecto a las mismas células no estimuladas y las líneas sus respectivas desviaciones estándares. Grupos de hámsteres (n=8) inmunizados con 200 µg del vector *pcDNA3* se usaron como control. Los asteriscos representan la diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo inmunizado con *pcDNA3* (p<0.05).

Siete días después del reto intraportal con trofozoitos amibianos virulentos (día 47), las células esplénicas provenientes de los hámsteres inoculados intradérmicamente con la combinación de los plásmidos, presentaron un incremento de 70 veces en la expresión de RNAm de la citosina TNF- α , en comparación a los niveles detectados en los animales controles sin inmunizar. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con los niveles presentes en las células esplénicas de los animales inoculados con *pcDNA3* (Fig 14A). En estas mismas muestras, las otras citocinas estudiadas (INF- γ , IL-4 y TGF- β) mostraron bajos niveles de expresión, sin haber diferencias entre los niveles de expresión en los bazo provenientes de los animales inoculados con la mezcla plasmídica y los provenientes de los animales controles inoculados con *pcDNA3* (Fig 14A). De manera interesante, en las células hepáticas de estos animales inoculados intradérmicamente con la mezcla de los plásmidos, se detectaron incrementos significativos de las citocinas proinflamatorias INF- γ (25 veces) y TNF- α (17 veces) en comparación con los niveles en los animales controles sin inocular (Fig 14B). Estos incrementos también fueron estadísticamente superiores a los observados en las células hepáticas provenientes de los animales inoculados con *pcDNA3* con valores de $p= 0.0004$ and $p= 0.04$ para las citocinas INF- γ y TNF- α respectivamente (Fig 14B). Las citocinas IL-4 y TGF- β , mostraron niveles de expresión muy bajos y no se detectaron diferencias entre los niveles presentes en las células hepáticas del grupo inoculado con la mezcla de

plásmidos y las del grupo inoculado con *pcDNA3* (Fig 14B). Este resultado nos indica que, después de la vacunación y reto con trofozoitos amibianos virulentos, los hámsteres inoculados intradérmicamente con la mezcla de los plasmados desarrollaron una fuerte respuesta inmune celular de tipo Th1 en el hígado.

Por el contrario a los resultados anteriormente mostrados y en concordancia con los resultados obtenidos de los ensayos de linfoproliferación celular, los hámsteres inoculados dos veces con DNA por la ruta intramuscular y que posteriormente fueron retados, presentaron muy bajos niveles de expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β tanto en bazo como en el hígado en el día 47 (Fig 14C, D).

6.13. Evaluación de los niveles de iNOS después del reto, en el bazo y el hígado de los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica o intramuscular.

Con anterioridad varios trabajos han resaltado el papel que tiene el óxido nítrico producido por los macrófagos activados en la destrucción del parásito *Entamoeba histolytica* (Lin y Chadee, 1992; Lin y col., 1994; Jarillo-Luna y col., 2002; Ramírez-Emiliano y col., 2005). En este complejo proceso se requiere la presencia de INF- γ , TNF- α y un antígeno amibiano para que se activen los macrófagos y en estos se eleven los niveles de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) la cual es la encargada de producir óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina. Es por ello que en este

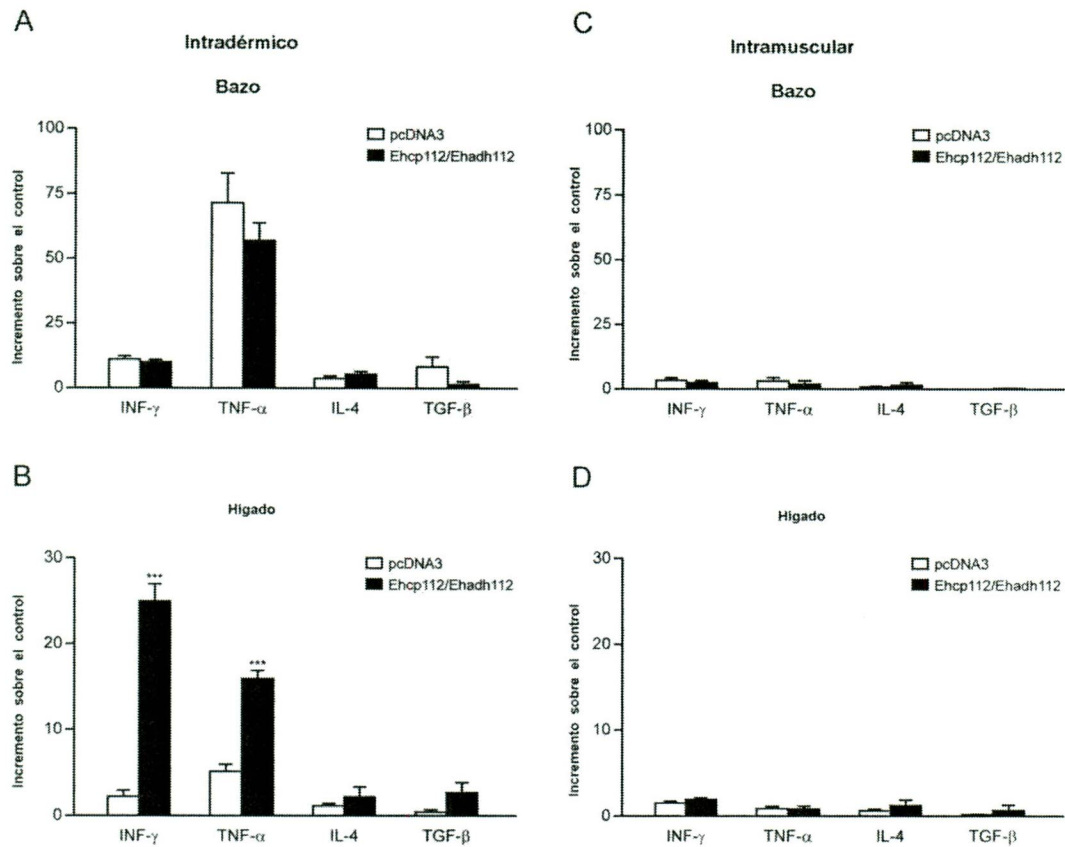


Fig. 14. Niveles de expresión de RNAm de las citocinas en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112* y retados intraportalmente con trofozoitos amebianos virulentos. El RNA total fue extraído a partir de bazos e hígados de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos o con *pcDNA3* como control y sacrificados en el día 47. Los niveles de expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β fueron cuantificadas a partir de 5 μ g de RNA total mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados expresan la diferencia entre los valores de Δ CT de la muestra analizada y el comparador (hámsteres no inmunizados). Cada barra representa la media de los valores de cada grupo (n= 8) con sus respectivas desviaciones estándares. Se muestran los niveles de expresión del RNAm de las citocinas en el bazo e hígado de los hámsteres inmunizados intradérmicamente (A y B) o intramuscularmente (C y D). Los asteriscos representan la diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo inmunizado con *pcDNA3* (p<0.05).

trabajo decidimos evaluar los niveles RNAm de la enzima iNOS en el bazo y en el hígado de los animales inmunizados y retados con trofozoitos virulentos de *E. histolytica* usando RT-PCR en tiempo real.

En los bazos e hígados de los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos por la ruta intradérmica se detectaron altos niveles de RNAm de la enzima iNOS (Fig 15A), aunque el análisis estadístico no reveló diferencias con respecto al grupo inmunizado con el vector *pcDNA3*.

Por el contrario en los animales inmunizados por la ruta intramuscular, se detectaron muy bajos niveles de expresión del RNAm de la enzima iNOS en bazo e hígado (Fig 15 B).

Teniendo en consideración estos resultados analizamos los niveles de citocinas e iNOS en hígados representativos de los animales inmunizados por ambas rutas con *pcDNA3* y animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos, pero en estos últimos analizamos hígados con alto nivel de daño e hígados con mayor resistencia a la invasión amibiana (poco daño).

En los hígados de los animales inmunizados con el vector *pcDNA3* por la ruta intradérmica se observó un gran número de abscesos hepáticos distribuidos por todo el lóbulo izquierdo (Fig 16A) y se detectaron muy bajos niveles de expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β así como de la enzima iNOS (Fig 16D). Sin embargo, al analizar los hígados de los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos se observó una gran reducción en el número de abscesos en algunos de ellos (Fig 16B) y un ligero incremento en los niveles de expresión de las citocinas INF- γ y TNF- α ,

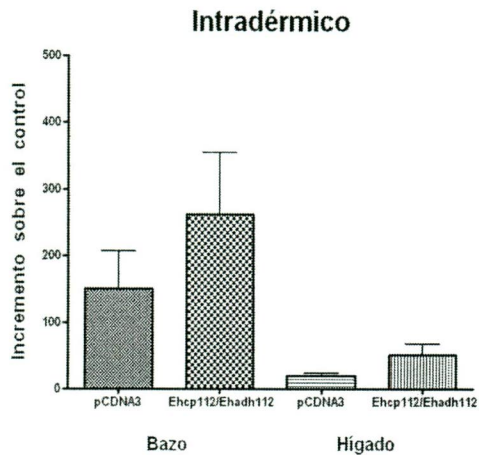
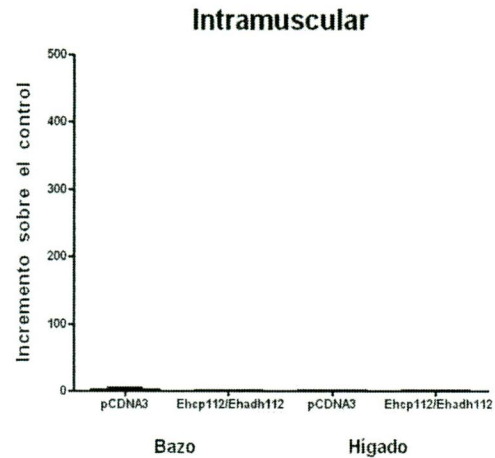
A**B**

Fig 15. Niveles de expresión de RNAm de la enzima iNOS en el bazo y en el hígado de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-adh112* y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos. El RNA total fue extraído a partir de bazos e hígados de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos o con *pcDNA3* como control y sacrificados en el día 47. Los niveles de expresión de la enzima iNOS fueron cuantificados a partir de 5 μ g de RNA total mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados expresan la diferencia entre los valores de Δ CT de la muestra analizada y el comparador (hámsteres no inmunizados). Cada barra representa la media de los valores de cada grupo (n= 8) con sus respectivas desviaciones estándares. Se muestran los niveles de expresión del RNAm de las citocinas en el bazo e hígado de los hámsteres inmunizados intradérmicamente (A) o intramuscularmente (B).

así como de la enzima iNOS, mientras que la citocinas IL-4 y TGF- β continúan teniendo muy bajos niveles de expresión (Fig 16D). Otros hámsteres de este mismo grupo mostraron hígados totalmente sanos (Fig 16 C) y un incremento mayor en los niveles de las citocinas INF- γ y TNF- α , pero sorprendentemente los niveles de expresión de la enzima iNOS se eleva considerablemente en ocho veces con respecto a los niveles observados en los animales inoculados con *pcDNA3*, mientras que la expresión de las citocinas IL-4 y TGF- β son muy bajos (Fig 16D).

Un comportamiento similar observamos en los hígados de los hámsteres inoculados por la ruta intramuscular. Los hígados de los animales inoculados con *pcDNA3* mostraron un elevado nivel de daño hepático (Fig 17A) y en estos hígados se detectaron muy bajos niveles de expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 y TGF- β así como de la enzima iNOS (Fig 17D).

Un comportamiento muy parecido se observó en los hígados de los hámsteres inoculados con la mezcla de los plásmidos pero que tenían daño hepático muy similar a los observados a los animales controles inoculados con *pcDNA3* (Fig 17B). Sin embargo, los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos por la ruta intramuscular, pero que mostraron una gran reducción del daño hepático frente al reto con trofozoitos amibianos virulentos (Fig 17C), expresaron mayores niveles de las citocinas INF- γ y TNF- α comparado con los anteriormente analizados y un incremento significativo en los niveles de expresión del RNAm de la enzima iNOS (Fig 17D).

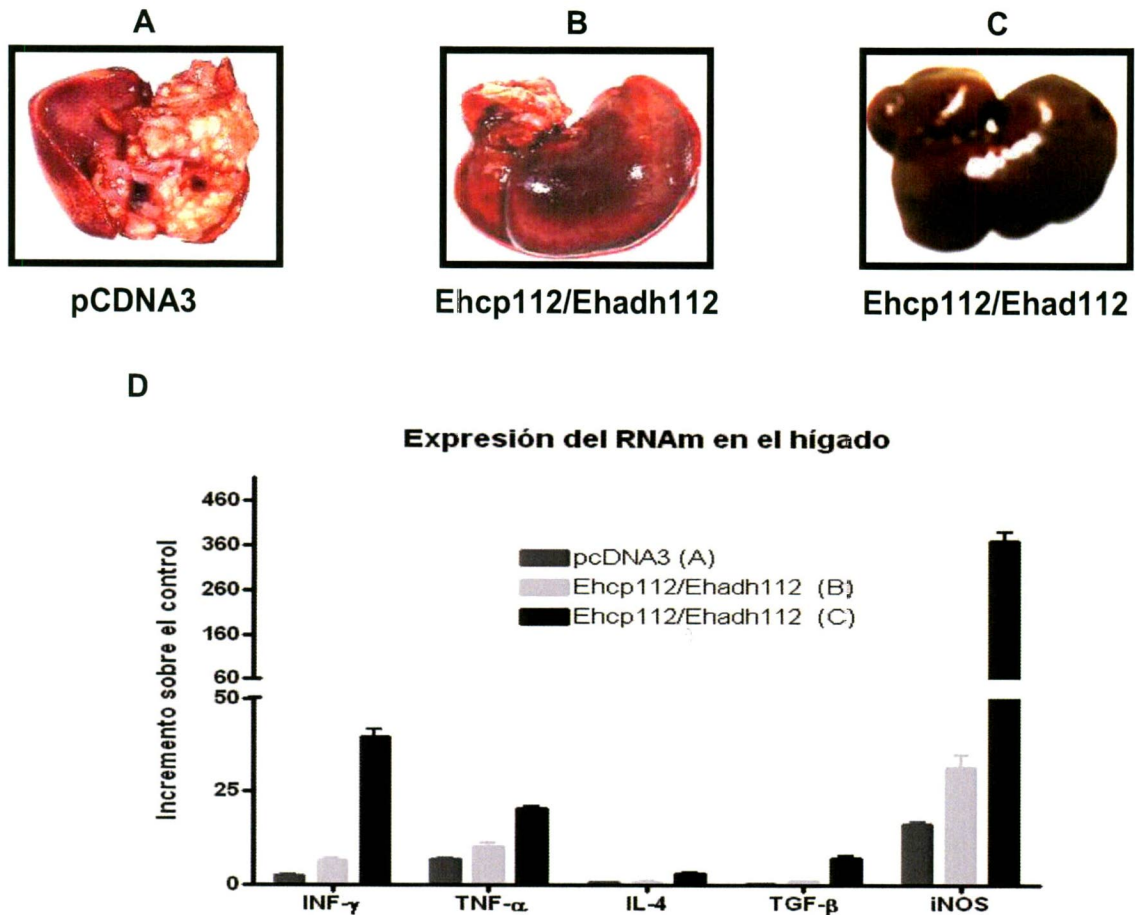


Fig 16. Niveles de expresión de RNAm de las citocinas y de la enzima iNOS en hígados de hámsteres inmunizados intradérmicamente y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos. El RNA total fue extraído a partir de hígados de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos o con *pcDNA3* como control y sacrificados en el día 47. Los niveles de expresión de las citocinas y de la enzima iNOS fueron cuantificados a partir de 5 μ g de RNA total mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados expresan la diferencia entre los valores de Δ CT de la muestra analizada y el comparador (hámsteres sin inmunizar y sin retar). Cada barra representa la media de los valores de cada grupo (n= 8) con sus respectivas desviaciones estándares. También se muestran fotos representativas de hígados provenientes de hámsteres inoculados con *pcDNA3* (A) o con la mezcla de plásmidos (B y C) a partir de los cuales se extrajo el RNA.

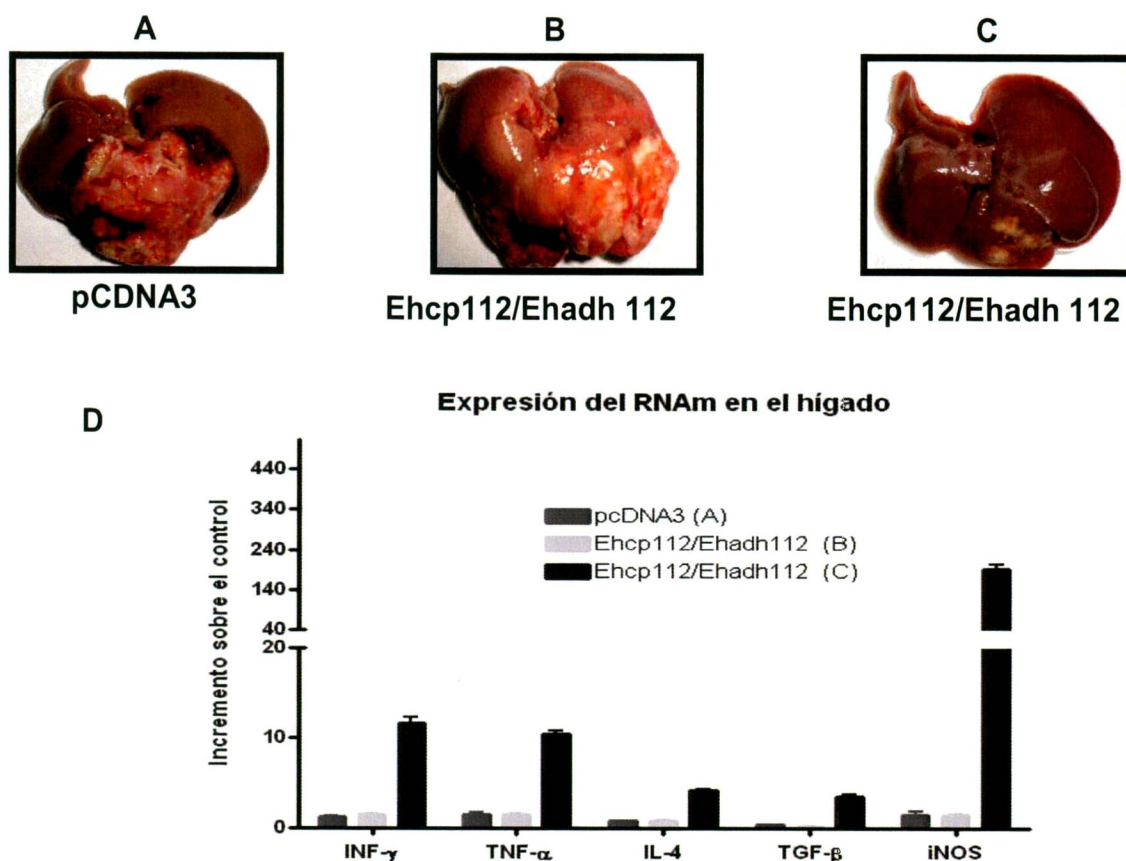


Fig 17. Niveles de expresión de RNAm de las citocinas y de la enzima iNOS en hígados de hámsteres inmunizados intramuscularmente y retados intraportalmente con trofozoitos amibianos virulentos. El RNA total fue extraído a partir de hígados de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos o con *pcDNA3* como control y sacrificados en el día 47. Los niveles de expresión de las citocinas y de la enzima iNOS fueron cuantificados a partir de 5 μ g de RNA total mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados expresan la diferencia entre los valores de Δ CT de la muestra analizada y el comparador (hámsteres no inmunizados). Cada barra representa la media de los valores de cada grupo (n= 8) con sus respectivas desviaciones estándares. También se muestran fotos representativas de hígados provenientes de hámsteres inoculados con *pcDNA3* (A) o con la mezcla de plásmidos (B y C) a partir de los cuales se extrajo el RNA.

7. Discusión

La vacunación con DNA plasmídico que codifique un antígeno determinado es una novedosa y prometedora tecnología en el desarrollo e investigación de nuevas vacunas. Los estudios realizados han mostrado que después de la administración del DNA, los antígenos codificados por el mismo son producidos de forma natural, procesados por las células presentadoras de antígenos y presentados conjuntamente con las moléculas de histocompatibilidad de clase I y de clase II, induciendo de esta manera una respuesta inmune de amplio rango, dentro de la cual se incluyen la respuesta inmune celular (Robinson y col., 1997; Ivory y Chadee, 2004), ya que se activan tanto las células T CD4+ auxiliaoras (Th1) como las células T CD8+ citotóxicas (CTL) (Ulmer y col., 1993; Donnelly y col., 1997; Nagata y col., 2004) y en algunos casos estas vacunas también pueden inducir una buena respuesta humoral (La Cava y col., 2000; Dupuis y col., 2000). La vacunación con DNA se ha evaluado en el desarrollo de vacunas antiparasitarias con muy buenos resultados y perspectivas (Chattergoon y col., 1998; Donnelly y col., 1997; Rothel y col., 1997; Zhang y col., 2001; Dumonteil y col., 2003). Con anterioridad hemos reportado que hámsteres inoculados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* produjeron una respuesta inmune humoral y celular específica, así como redujeron significativamente el daño hepático producido por trofozoitos amibianos virulentos (Madriz y col., 2004).

7.1. Expresión de las proteínas EhCP112 y EhADH112 y sus respectivos RNAm en diferentes órganos después de la inoculación intradérmica o intramuscular de la mezcla de plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh12*.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo inmunológico que media la respuesta inmune protectora inducida por estos antígenos amibianos, en este trabajo estudiamos el patrón de expresión de las proteínas *EhCP112* y *EhADH112*, así como de sus RNAm en diferentes órganos obtenidos de hámsteres inoculados intradérmicamente o intramuscularmente con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*. Ambos genes fueron expresados en los animales intradermicamente o intramuscularmente inmunizados. Sin embargo, se encontró que el RNAm del gen *Ehcp112* se expresó mejor en los animales inmunizados por la ruta intramuscular en comparación con aquellos que fueron inmunizados por la ruta intradérmica. Por el contrario la expresión de RNAm del gen *Ehadh112* tuvo una expresión más estable en los animales inmunizados por la ruta intradérmica. Con respecto a los sitios de inoculación, los transcritos no fueron detectados en la piel, pero se expresaron abundantemente en el músculo. A pesar de este resultado, descartamos la posibilidad de una rápida degradación de los plásmidos en la piel porque detectamos la expresión de los RNAm y las proteínas correspondientes en los bazo e hígados de los hámsteres inoculados con la mezcla plasmídica, sugiriendo que los plásmidos fueron transportados de la piel a estos

órganos. Es muy posible que la movilización de los plásmidos a órganos distantes del sitio de inoculación como el bazo y el hígado se produjera más rápido en los animales inoculados intradérmicamente que en los inoculados intramuscularmente. Con anterioridad se ha reportado una prolongada expresión de antígenos en el músculo de los animales inmunizados utilizando este mismo vector (*pcDNA3*) (Coelho-Castelo y col., 2006) o vectores diferentes (Wolff y col., 1992). La expresión prolongada en este órgano se ha asociado con las características estructurales del mismo, como la de poseer células multinucleadas (Wolff y col., 1992). Es posible que las diferencias estructurales entre el músculo y la piel sean las responsables de que en nuestro trabajo encontráramos diferencias en la expresión de los RNAm y de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en estos dos sitios de inoculación.

Aunque en nuestro estudio no evaluamos la expresión en el timo, se ha reportado que una prolongada expresión de los antígenos en el músculo después de la vacunación con DNA, puede permitir la llegada del antígeno al timo de los animales vacunados donde se induce tolerancia por delección de las células T específicas y de esta forma se altera la respuesta inmune (Coelho-Castelo y col., 2006). Este resultado experimental pudiera explicar la baja respuesta tanto humoral como celular encontrada en los hámsteres inmunizados por la ruta intramuscular.

También existen reportes que describen la distribución de los plásmidos por todo el organismo (Parker y col., 1999; Oh y col., 2001; Koshkina y col.,

2003; Tuomela y col., 2005). Sin embargo, se desconoce el mecanismo involucrado en dicha distribución. Se ha planteado la posibilidad de que se produzca tanto el transporte del plásmido libre a través de la sangre o la linfa, como el transporte del mismo dentro de células transfectadas (Dai y col., 1992).

Reportes publicados con anterioridad indican que las vacunas de DNA inoculadas intradérmicamente o intramuscularmente son internalizadas por células como las CD11b⁺ (La Cava y col., 2000), CD11c (Dupuis y col., 2000; Chattergoon y col., 1998), CD11c y CD19 (Coelho-Castelo y col., 2003) y transportadas por el suero o la linfa en el interior de las células transfectadas hasta órganos distantes donde pueden expresar transitoriamente los genes codificados en la vacuna de DNA y donde se puede orquestar la respuesta inmune (Dupuis y col., 2000; Forg y col., 1998; Maeda y col., 2004; Dai y col., 1992).

Las células dendríticas desempeñan un papel activo en el proceso de movilización de los plásmidos y en la piel se encuentran accesibles un gran número de células dendríticas (células de Langerhans y células dendríticas dermales) y los queratinocitos, cuyo número aumenta en respuesta a un daño, liberando diferentes citocinas como IL-1, GM-CSF y TNF- α . Estas citocinas pueden promover la maduración de las células dendríticas y con esto inducir su migración a los linfonodos regionales y a órganos distales donde presentan antígenos peptídicos a células T vírgenes y desencadenando la respuesta inmune.

La expresión del RNAm y las proteínas EhCP112 y EhADH112 fueron detectadas en el músculo de manera prolongada. Sin embargo, en el músculo las células dendríticas son menos frecuentes que en la piel, dejando abierta la posibilidad de que diferentes mecanismos de transporte de los plásmidos pudieran estar participando en las dos rutas de inoculación usadas.

Se obtuvieron resultados coincidentes entre el perfil de expresión del RNAm y de las proteínas EhCP112 y EhADH112, pero la expresión estuvo en dependencia del tejido analizado, de la ruta de inoculación y del tiempo transcurrido después de la inoculación. Es posible que la expresión de estas proteínas en diferentes órganos tenga una influencia directa sobre el nivel de protección obtenido en los hámsteres vacunados. Desde el punto de vista de la vacuna, una expresión corta en el sitio de inoculación previene la tolerancia sistémica inducida por la exposición repetida al antígeno (Sedgwick and Holt, 1985). Sin embargo, se requiere una exposición más prolongada del antígeno en los órganos linfoides secundarios para inducir una respuesta inmune específica y eficiente (Lowrie y col., 1999). Lo anterior concuerda con nuestros resultados obtenidos en los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica donde se observa una fuerte respuesta celular y una mayor protección.

Interesantemente, ambas proteínas se expresaron en los hígados de los animales inmunizados con la mezcla de los plásmidos y su expresión en este órgano pudiera incrementar el estado de maduración de las células mononucleares hepáticas y de esta manera puede favorecer un incremento en la eficacia de la vacunación.

Las células dendríticas hepáticas están presentes en muy bajo número en los hígados de los animales sanos donde estas células presentan un fenotipo de células dendríticas inmaduras, expresando bajos niveles de moléculas MHC de clase II en su superficie así como bajos niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Las células dendríticas con este fenotipo inducen tolerancia en lugar de activación de las células T CD4+ (Zarembek y col., 2002; Thomson y col., 1999; Thomson y col., 1999a). Las células dendríticas de los hígados sanos inducen la secreción de IL-10 y de IL-4 en las células mononucleares hepáticas y mantienen los niveles de INF- γ lo suficientemente bajos como para permitir la promoción de tolerancia en este órgano (Thomson y col., 1999). La maduración de las células dendríticas hepáticas ocurre en respuesta a la estimulación antigénica y depende de señales del ambiente, incluyendo la presencia de citocinas y receptores que se unen a motivos estructurales conservados en los microorganismos (por ejemplo motivos CpG que son el blanco de los TLR-9). Por lo tanto, la maduración y activación de las células dendríticas es una etapa crítica en el momento en que estas se encuentran con los antígenos (Goddard y col., 2004; Shortman y col., 2002). Una vacunación

efectiva con DNA que suministre la señal de peligro así como una pequeña cantidad de antígenos en el hígado pudiera revertir el estado de tolerancia del hígado y preparar a las células hepáticas para combatir a los patógenos.

La distribución y eficacia de las vacunas de DNA también se han correlacionado con la dosis administrada (Coelho-Castelo y col., 2006), lo que pudiera explicar la mejor eficacia obtenida en nuestros experimentos con respecto a lo anteriormente publicado inmunizando con la misma mezcla de plásmido en menor dosis por la ruta intradérmica (Madriz y col., 2004). Al administrar una menor dosis es posible que los antígenos no lleguen eficientemente a los órganos linfoides secundarios y por consecuencia se produzca una menor estimulación de la respuesta inmune específica.

7.2. Respuesta inmune inducida en los hámsteres inoculados por la ruta intradérmica o intramuscular con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*.

Se ha conseguido repetidamente inmunidad adquirida contra la amibiasis invasiva en modelos de roedores de esta enfermedad. La protección ha sido obtenida inmunizando con antígenos totales amibianos (Tanimoto-Weki y col., 1973) con antígenos purificados cromatográficamente (Brian y col., 1995), con antígenos amibianos adyuvados con CpG (Ivory y col. 2006) o administrando los antígenos codificados en vacunas de DNA generando tanto una respuesta inmune humoral como celular (Madriz y col., 2004;

Gaucher y Chadee, 2002). Sin embargo, no está claro el papel de la respuesta inmune humoral sistémica en la resistencia frente a la amibiasis invasiva. Se ha documentado que el progreso en el desarrollo de abscesos hepáticos amibianos, no se afecta por la presencia de altos niveles de anticuerpos en el suero (Salata, 1988) y que la reinfección es un proceso frecuente en individuos curados que poseen altos niveles de anticuerpos anti-amibianos (Salata, 1988). Si bien, en modelos animales se ha logrado la protección contra el AHA mediante la administración pasiva de anticuerpos (Myung y col., 1992; Zhang y col., 1994; Marinets y col., 1997), los estudios de inmunización activa realizados con animales de laboratorio han demostrado la falta de correlación entre los títulos de anticuerpos existentes a nivel sistémico antes del reto con trofozoitos amibianos virulentos y la protección (Haque y col., 2001). Por otra parte, se han acumulado evidencias experimentales que indican que la respuesta celular, específicamente la respuesta Th1, tiene un papel de suprema importancia en la defensa del hospedero y en la resistencia de este frente a la invasión de *E. histolytica*. Una respuesta Th1 caracterizada por altos niveles de IL-2 y TNF- α y bajos niveles de IL-4 correlaciona con la resolución de AHA en jerbos (Campbell and Chadee, 1997). Conjuntamente con lo anterior, se ha demostrado que los macrófagos murinos y humanos activados con las citocinas Th1 manifiestan actividad amebicida (Denis y col., 1989; Seguin y col., 1997; Seydel y col., 2000), matando a los trofozoitos amibianos virulentos mediante la producción de NO (Denis y

col., 1989; Seguin y col., 1997), mientras que los neutrófilos previamente incubados con INF- γ y/o TNF- α , matan a los trofozoitos amibianos virulentos por un mecanismo dependiente de peróxido de hidrógeno (Seguin y col., 1997).

Por lo tanto, es muy importante determinar la respuesta inmune asociada con la protección obtenida en cada modelo de estudio, ya que esto nos va a permitir obtener conclusiones y tomar acciones encaminadas a mejorar la eficacia de la vacunación y de la protección inducida por dicha vacunación.

7.2.1. Respuesta inmune humoral.

Nuestros resultados mostraron que aunque las proteínas EhCP112 y EhADH112 fueron expresadas eficientemente en diferentes órganos, la respuesta humoral obtenida en estos experimentos fue muy baja, aún después del reto con trofozoitos amibianos virulentos y con independencia de las rutas de inoculación usadas.

Este resultado pudiera deberse a la relativa alta dosis de plásmido inoculada y al corto esquema de inmunización usado durante el experimento. Nuestros resultados anteriores han mostrado que utilizando una dosis de 50/50 μg de la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, se requirieron tres inoculaciones y más de 40 días para generar una respuesta inmune humoral específica en los hámsteres inoculados (Madriz y col., 2004). Se ha demostrado que el empleo de un esquema corto de dos inmunizaciones en un intervalo de 28 días tanto por la ruta intradérmica como por la ruta intramuscular producen muy bajos

niveles de anticuerpos comparado con un esquema más largo de 45 días entre las inmunizaciones (Leitner y col., 1997). Además se ha reportado que se puede inducir un alto título de anticuerpos específicos contra los antígenos codificados sólo después de tres inoculaciones con una vacuna de DNA (Carter y Keer, 2003; Vercammen y col., 2000) o modificando el plásmido para incrementar la expresión del antígeno codificado (Leitner y col., 1997). El uso de altas dosis de plásmido implica la administración de una mayor cantidad de motivos CpG, presentes en el plásmido. Estos motivos CpG inducen preferencialmente una respuesta inmune celular de tipo Th1 estimulando a los macrófagos y otras células para que produzcan IL-12 (Arthur, 2002).

Otra posibilidad que la actividad residual de los efectores de la respuesta inmune eliminen a las células productoras de antígenos, y con ello se limita a la correcta estimulación de las células T cooperadoras, necesarias para la activación de células B específicas. Pero debido a que en nuestro ensayo sólo medimos anticuerpos IgG, no podemos descartar que se estén generando otra clase de anticuerpos como IgM.

Los bajos niveles de anticuerpos encontrados durante nuestros experimentos también pueden estar influenciados por la naturaleza del antígeno. Los estudios de inmunohistoquímica mostrados en este trabajo, así como los experimentos de inmunocitoquímica realizados con anterioridad (Madriz y col., 2004) utilizando las construcciones plasmídicas *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, han revelado que las proteínas

EhCP112 y EhADH112 se expresan principalmente en la superficie de las células transfectadas, resultando ser menos eficientes para inducir una respuesta inmune humoral que los antígenos secretados (Boyle y col., 1997). Otro factor que puede estar influyendo en los resultados es el modo de aplicación. En los experimentos mostrados en este trabajo inoculamos los plásmidos usando una jeringa y se ha demostrado que este método de aplicación es menos efectivo para inducir una respuesta de anticuerpos que cuando se utiliza una pistola de genes u otro medio de aplicación de mayor presión (Carter y Kerr, 2003).

Todos estos factores o muy probablemente la combinación de estos factores contribuyeron a la baja respuesta humoral obtenida en los hámsteres vacunados tanto por la ruta intradérmica como por la ruta intramuscular.

Se debe destacar el hecho de que esta baja respuesta humoral obtenida en los animales vacunados por la ruta intradérmica puede haber contribuido a la mayor respuesta protectora observada después del reto con trofozoitos virulentos. Estudios realizados con anterioridad mostraron que la presencia de altos niveles de anticuerpos contra la amiba en el suero no afecta la formación de los abscesos hepáticos sino que más bien correlacionan con un incremento en la susceptibilidad a padecer la infección (Haque y col., 2001; Salata y Ravdin, 1998).

7.2.2. Respuesta inmune celular.

Los hámsteres inmunizados por la ruta intradérmica presentaron una respuesta linfoproliferativa la cual fue estadísticamente superior a la presentada por el grupo inmunizado con el vector *pcDNA3* en el día cuarenta del experimento. Estas diferencias se hicieron significativamente mayores en el día 47 (siete días después del reto con trofozoitos virulentos).

En el bazo de los animales vacunados con la mezcla de plásmidos se pudo detectar una respuesta inmune celular de tipo Th1 caracterizada por una alta expresión del mensajero de TNF- α , aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo inmunizado con el vector. En el hígado de los animales inmunizados intradérmicamente con la mezcla de los plásmidos se encontró una respuesta de tipo Th1 con altos niveles de INF- γ y TNF- α la cual fue estadísticamente superior a la respuesta presentada en los animales que fueron inoculados con el vector vacío.

Sorprendentemente, los hámsteres inmunizados con la mezcla de plásmidos por la ruta intramuscular mostraron una baja respuesta linfoproliferativa, similar a la presentada en los hámsteres inyectados con el vector. Esta baja respuesta linfoproliferativa disminuye aún más después del reto intraportal con trofozoitos vivos virulentos. En estos experimentos se observaron muy bajos niveles de estimulación con las proteínas recombinantes. De manera similar se encontraron bajos niveles de expresión de los mensajeros de las citocinas en el bazo y en el hígado de los

animales inmunizados intramuscularmente veinte días después de la segunda inmunización (día 40) así como siete días después del reto intraportal (día 47). Estos resultados pudieran deberse a un efecto de la ruta de inoculación o debido a la inducción de tolerancia inmunológica. Sin embargo, para probar lo anterior se requieren realizar nuevos experimentos.

La respuesta Th1 encontrada en los animales inmunizados por la ruta intradérmica puede estar altamente influenciada por el efecto adyuvante de los motivos CpG no metilados presentes en el vector *pcDNA3*. Como se ha reportado con anterioridad, estos motivos CpG son reconocidos por los TLR-9 presentes en los granulocitos, monocitos, células B, células NK y células dendríticas (La cava y col., 2000). Después del reclutamiento de dos o mas TLR-9 se produce la activación de este receptor seguido del reclutamiento y fosforilación secuencial de MyD88, la sinaza asociada a IL-1 denominada IRAK-4 y el factor 6 asociado al receptor de TNF denominado TRAF-6, lo cual conlleva a la degradación de I κ B, permitiendo la translocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B facilitando la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12 (Wu y col., 2004; Klinnan y col., 2003).

La activación del sistema inmune innato por esta vía resulta en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno, citocinas, quimiocinas y un incremento en la presentación antigénica a las células del sistema inmune adaptativo y combinado un antígeno produce

una fuerte respuesta Th1, caracterizada por la generación de INF- γ y CTL (Krieg y col., 2001). Lo anterior, no sólo explica nuestros resultados experimentales, sino que también concuerda con lo reportado anteriormente en la literatura, ya que la protección contra la amibiasis correlaciona con elevados niveles de INF- γ y una alta respuesta proliferativa. El INF- γ es una citosina que caracteriza a la respuesta celular de tipo Th1 y estimula *in vitro* la actividad amebicida en las células inmunes (Denis y Chadee, 1998; Schain y col., 1992). Estudios realizados en Bangladesh, han correlacionado la elevada producción de INF- γ con un menor riesgo a padecer la amibiasis (Haque y col., 2007). Nuestros resultados también coinciden con los reportados al inmunizar jerbos y ratones con antígenos adyuvados con oligonucleótidos conteniendo motivos CpG, en lo que se muestra que la secreción local de INF- γ estimulada específicamente por antígenos amibianos puede generar una respuesta protectora contra la amibiasis (Ivory y Chadee, 2007).

Se ha demostrado *in vitro*, que en sistemas libres de células inmunes, altas concentraciones de INF- γ y TNF- α o combinaciones de estas dos citocinas no son capaces de matar directamente a los trofozoitos amibianos o de reducir su viabilidad o multiplicación en cultivo (Denis y Chadee, 1988a). Sin embargo, el INF- γ actúa conjuntamente con el TNF- α activando a los macrófagos murinos y a los neutrófilos humanos, los cuales adquieren la capacidad de matar a los trofozoitos *in vitro* (Lin y col., 2004). Lo que

demuestra que el INF- γ , tiene un papel importante en la resistencia innata y específica frente a la infección amibiana.

Los hámsteres (*Mesocricetus auratus*) son altamente susceptibles a infecciones virales, bacterianas y por protozoos parásitos y se piensa que esto ocurre por deficiencias en la señalización a través del receptor del interferón gamma (Zhao y col., 2006).

Se debe destacar que el INF- γ , estructuralmente posee 17 aminoácidos adicionales en su extremo carboxilo terminal que lo diferencia del INF- γ de ratón y rata (Melby y col., 1998; Lundell y col., 1991). Estos aminoácidos extra disminuyen su actividad biológica ya que disminuyen la interacción con su receptor. Al eliminar estos residuos adicionales el INF- γ y de hámster se incrementa en aproximadamente 10 veces su actividad y capacidad de señalar a través de la vía JAK-STAT (Zhao y col., 2006).

Estos resultados pueden explicar por qué algunas cepas de ratones son resistentes a la infección amibiana mientras que otras son susceptibles, al igual que lo son los hámsteres, los jerbos y los humanos, ya que todos ellos comparten este defecto de señalización a través del receptor de INF- γ (Zhao y col., 2006). También nos permite explicar nuestros resultados experimentales donde encontramos que sólo aquellos hámsteres capaces de producir elevados niveles de INF- γ en el hígado, fueron capaces de eliminar eficientemente a los trofozoitos amibianos. Posiblemente actuando conjuntamente con el TNF- α para activar a los macrófagos locales del hígado, para que estos eliminen a las amibas mediante la producción de

óxido nítrico. Sin descartar la participación de otros mecanismos celulares que pudieran cooperar en la protección como se discute a continuación.

7.2.2.1. Niveles de RNAm de la enzima iNOS en animales inmunizados y retados

El NO producido por la enzima iNOS de los macrófagos activados por el INF- γ , ha sido descrito como uno de los mecanismos efectores más efectivos contra la amiba. En nuestro trabajo encontramos altos niveles de expresión de RNAm de la enzima Inos en el bazo y en el hígado de los animales inmunizados intradérmicamente pero muy bajos niveles de expresión en los animales inoculados intramuscularmente. Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunados con la mezcla de los plásmidos y los controles vacunados con *pcDNA3*. Sin embargo, el análisis de hígados individuales procedentes de animales inoculados por ambas rutas sugiere, que si hay una relación directa entre la expresión de Inos y la disminución del daño hepático en los animales vacunados y retados con trofozoitos virulentos.

Estos resultados concuerdan con algunos estudios realizados anteriormente, donde se muestra que el óxido nítrico producido por los macrófagos activados, es capaz de inhibir a las cisteínas proteasas y a la enzima alcohol deshidrogenasa 2 (Siman-Tov y Ankri, 2003), las cuales constituyen factores de virulencia muy importantes en la amiba. Además, se ha observado que los ratones deficientes en iNOS son más susceptibles

a padecer AHA y apoptosis de hepatocitos inducida por *E. histolytica* (Seydel y col., 2000), sugiriendo que el NO tiene un papel muy importante en la defensa contra la amibiasis.

Mucha de la muerte celular observada durante el desarrollo del AHA proviene de la apoptosis inducida por *E. histolytica*. Este parásito induce la apoptosis de los hepatocitos y otras células activando la maquinaria apoptótica distal directamente a nivel de la caspasa-3 y por mecanismos independientes de Fas y de TNF (Seydel y Stanley, 1998a; Huston y col., 2000). El NO puede inhibir la apoptosis en hepatocitos por medio de diferentes mecanismos. Se ha demostrado que suprime los incrementos de caspasa-3 en los hepatocitos frente a la acción de TNF, Fas y la muerte espontánea (Kim y col., 1997). El NO es capaz de nitrosilar una cisterna presente en el sitio activo de las cisternas proteasas como las caspasas y de esta forma, no sólo bloquea su actividad sino también su activación proteolítica (principalmente en las caspasas 3 y 8). Se ha demostrado que este efecto puede ser mimetizado por análogos de GMPc y mediado por la activación de la proteína cinasa G (Kim y col., 1997). La inhibición de la activación de las caspasas conlleva a la inhibición de la degradación de Bcl-2 con lo que se evita la despolarización mitocondrial y se inhibe la liberación de citocromo c en los hepatocitos. Estos estudios demuestran que el NO y sus productos de reacción pueden interactuar directa o indirectamente con la cascada de señalización de la apoptosis a diferentes niveles y por lo tanto el NO puede inhibir la apoptosis hepática (Kim y col.,

1997). Otros mecanismos mediante los cuales el NO inhibe al apoptosis incluyen la regulación positiva de Bcl-2, ruptura de la vía de señalización c-Jun y regulación positiva en la expresión de la proteína de choque térmico (HSP70) (Kim y col., 1997a).

Además de proteger a los hepatocitos contra la apoptosis, el NO puede proteger también a linfocitos B, eosinófilos, esplenocitos y a células endoteliales (Kim y col., 1999).

Con nuestro estudio no podemos descartar la participación de otras células como los linfocitos $T\gamma\delta$ o las células NK del hígado en la protección conferida por la ruta intradérmica. Se ha demostrado que las células NK y NKT juegan un papel importante en la protección contra la formación de AHA. Mediante la producción de $INF-\gamma$ y péptidos citolíticos. Resultados que concuerdan con la detección temprana de las células NK durante la infección amibiana en modelos murinos de AHA (Tsutsumi y col., 1984; Lotter y col., 2006). También se ha reportado una mayor actividad citotóxica mediada por las células NK en ratones infectados con amibas patógenas en comparación con ratones infectados con amibas no patógenas (Kim y col., 1993), lo que sugiere un papel relevante de estas células en la defensa inmune contra la amiba en este modelo. Otro estudio demostró que los ratones B6 hembras son más resistentes a la amibiasis hepática que los machos. Esta resistencia está asociada a la producción de un mayor nivel de $INF-\gamma$ por las células NKT, lo que contribuye a una eliminación más rápida de los trofozoitos amibianos del hígado (Lotter y col., 2006). Estos

resultados destacan el papel que tiene el INF- γ en la protección contra la formación de AHA.

7.3. Protección contra la formación AHA.

El análisis del daño hepático en los animales vacunados y retados intraportalmente con trofozoitos virulentos, reveló que en los animales vacunados intradérmicamente con la mezcla de plásmidos se produce una reducción significativa de la formación de los abscesos hepáticos y una mayor supervivencia que en los animales vacunados con el vector *pcDNA3*. Contrario a los resultados obtenidos en la ruta intradérmica, la pobre respuesta inmune celular encontrada en los animales vacunados intramuscularmente se corresponde con la baja protección y la menor sobrevivencia obtenida en dichos animales después del reto con trofozoitos amibianos virulentos. Este resultado se puede explicar considerando que la activación de las células T CD4⁺ puede ser asistida o incrementada por las citocinas producidas por las células dendríticas hepáticas (Abe y col., 2001; Katz y col., 2005). Las células dendríticas pueden conectar la respuesta inmune innata en el hígado con la respuesta inmune adaptativa frente al mismo antígeno. Nuestros resultados indican que después de la inoculación intradérmica de los hámsteres con la mezcla de los plásmidos se produjo una activación efectiva de las células T CD4⁺. Por el contrario, después de la inoculación intramuscular es muy probable que las células dendríticas hepáticas hayan diferenciado a un estado semimaduro, en el cual al interactuar con las células T CD4⁺ promueven funciones abortivas

en estas células. Sin embargo, los experimentos realizados no permiten confirmar esta hipótesis.

Tomando en conjunto estos resultados, podemos plantear la hipótesis de que la protección lograda por esta vacuna en el modelo de hámster, está más relacionada a un efecto local en el hígado que a nivel sistémico. La protección pudiera estar relacionada a un perfil de bajos niveles de anticuerpo y una alta respuesta inmune celular de tipo Th1. Este perfil de respuesta inmune constituido por altos niveles de INF- γ y bajos niveles de anticuerpos es típico de la protección contra la malaria (Kumar y col., 2002) y pudiera también funcionar en la protección contra la amibiasis.

La inoculación intradérmica de los hámsteres con la mezcla de los plásmidos incrementó tanto la protección como la sobrevivencia de los animales retados con trofozoitos virulentos. Este resultado debe estar altamente influenciado por el efecto adyuvante de los motivos CpG presentes en el vector, ya que estos motivos pueden actuar como “señal de peligro” y de esta manera incrementar una respuesta inmune de tipo Th1 después de la vacunación con DNA. Un resultado similar fue mostrado por Ivory y colaboradores (2006) quienes probaron que oligonucléotidos que contenían este motivo pueden incrementar la respuesta inmune protectora generada por la lectina Gal/GalNAc y prevenir la formación de abscesos hepáticos amibianos en el modelo de jerbo. Sin embargo, las diferencias en los niveles de protección contenidos en este trabajo por las dos rutas de inoculación estudiadas usando la misma cantidad de plásmidos indicó que

otros factores además de la influencia de estos motivos CpG influyeron la respuesta inmune Th1 inducida en los animales intradérmicamente vacunados.

El nivel de protección obtenido en este trabajo por la ruta intradérmica inmunizando los hámsteres con una mezcla (100/100 µg) de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* y administrando dos dosis cada veinte días (87.9%) fue superior al obtenido con anterioridad con la misma mezcla de plásmidos y por la misma ruta (50%), pero usando una cantidad menor (50/50 µg) y un esquema de tres dosis cada veinte días (Madriz y col., 2004). Estos resultados pueden estar influenciados por la mayor dosis de plásmidos y el esquema de inmunización más corto usado en nuestros experimentos. Estas condiciones experimentales favorecen el desarrollo de una respuesta inmune celular de tipo Th1 con incremento en los niveles de INF- γ y un aumento en la protección contra el daño hepático. La protección obtenida por la ruta intradérmica también es comparable con los resultados obtenidos en jerbos con un plásmido codificando el antígeno SREHP (Zhaneg y Stanley, 2000a).

8. Conclusiones.

1. La inmunización intramuscular e intradérmica de hámsteres con la combinación de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, induce la expresión *in vivo* de los transcritos y las proteínas correspondientes, pero siguiendo cinéticas diferentes.
2. La inoculación de la mezcla plasmídica por vía intramuscular o intradérmica, indujo muy baja respuesta IgG específica contra las proteínas recombinantes y contra trofozoitos amibianos.
3. Los experimentos realizados hasta el momento sugieren que la respuesta inmune celular es fundamental para la protección contra el absceso hepático amibiano, y el estudio del patrón de citocinas indica que esta protección puede estar mediada por una respuesta Th1 local en el hígado.
4. La inmunización intradérmica con la combinación de los plásmidos *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112*, produce una protección estadísticamente superior a la ruta intramuscular evidenciada mediante evaluación del daño hepático y análisis de supervivencia.

9. Perspectivas.

1. Comprobar el perfil de expresión de citocinas a nivel proteico.
2. Estudiar las vías de señalización y el mecanismo de protección asociado a la reducción del daño hepático después de la vacunación con la mezcla de los plásmidos.
3. Analizar nuevas estrategias de vacunación por la ruta intradérmica utilizando adyuvantes que potencien la respuesta Th1 local en el hígado y mejoren la eficacia de la vacuna.
4. Evaluar la duración de la inmunidad conferida a los hámsteres vacunados intradérmicamente con la mezcla de plásmidos.
5. Determinar si la inmunización con la mezcla de plásmidos producen anticuerpos anti-DNA.
6. Determinar si después de la inmunización intramuscular de los hámsteres con la mezcla de plásmidos, se induce tolerancia inmunológica.

10. Bibliografía

- Abe M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. 2001. Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors: role of these progenitors as immunogenic resident antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol* 34:61–67.
- Abd-Alla MD, Ravdin JI. 2002. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt *Trop Med Int Health* 7(4):365–370.
- Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolomi P, Zárata L, Millán-Velazco F, Schoolnick G, Wirth D. 1993. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 48:58–70.
- Albach R. A. 1989. Nucleic Acids of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 36 (2):197–205.
- Alba-Hurtado F, Díaz Otero F, Valdivia G, Reyes R, Tsutsumi V, Acosta G. 1999. Cellular immune response of intracecal inoculated Mongolian gerbils with *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Rev latinoam Microbiol* 41: 205-210.
- Andra J, Berninghausen O, Leippe M. 2004. Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS letters* 564(1-2): 109-115.

- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* 28: 777-785.
- Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. 1999. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* 67:421-422.
- Ankri S. 2002. Strategies of protozoan parasite *Entamoeba histolytica* to evade the innate immune responses of intestinal epithelial cells. *J. Biosci.* 27(6) Suppl.3: 609-614.
- Archarya DP, and Sen PC. 1981. E rosetting cell in amebic liver abscess. *Indian J Med Res* 74:348.
- Arhets P, Gounon P, Sansonetti P, and Guillen N. 1995. Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 63: 4358-4367.
- Arroyo-Begovich A y Carabez-Trejo A. 1982. Location on chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J Parasitol* 68: 253-258.
- Arroyo R y Orozco E. 1987. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23: 151-158.

- Asgharpour A, Gilchrist C, Baba D, Hamano S, Houpt E. 2005. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-11 cells. *Infect Immun* 73:4522–4529.
- Arthur MK. 2002. CPG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709–760.
- Bakatselou C, Kidgell C and Graham Clark C. 2000. A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 110:177-182.
- Bakker-Grunwald, T. and C. Wöstmann. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* 9:27–31.
- Baldauf SL, Palmer JD y Doolittle WF. 1996. The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7749–7754.
- Bañuelos C, García-Rivera G, López-Reyes I, Orozco E. 2005. Functional characterization of EhADH112: An *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology* 110: 292–297.
- Befus D, Bienenstock J. 1982. Factors involved in symbiosis and host resistance at the mucosal interface. *Prog Allergy* 31: 76-177.
- Bernal-Redondo, R. 2001. Entamoebosis-amibiiasis intestinal *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 58(4): 217-219.

- Bhattacharya A, Arya R, Clark CG y Ackers JP. 2000. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology* 120:31-35.
- Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Mysok B, Buss H, Tannich E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 66:578-583.
- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengeløv H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. 1993. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 51:187-198.
- Boyle JS, Koniaras C, Lew AM. 1997. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9:1897-1906.
- Bracha R, Mirelman D. 1983. Adherence and ingestion of *Escherichia coli* serotype 055 by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 40: 882-887.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem* 72: 248-254.
- Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ and Petri WA Jr. 1992. Inhibition of the complement membrane

- attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest 90:1131-1137.
- Brian L. Kelsall and Jonathan I. Ravdin. 1995. Immunization of Rats with the 260-Kilodalton *Entamoeba histolytica* Galactose-Inhibitable Lectin Elicits an Intestinal Secretory Immunoglobulin A Response That Has *In Vitro* Adherence-Inhibitory Activity. Infection and Immunity 63: 686-689.
- Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C, Tannich E. 1993. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol. 12: 925.
- Bruchhaus I and Tannich E. 1994. Induction of iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. Mol Biochem Parasitol 67: 281-288.
- Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M and Tannich E. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. Mol Microbiol 22: 255-263.
- Bruchhaus I, S Richter, and E Tannich. 1997 Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. Biochem J 326:785-789.
- Bruchhaus I, S Richter, and E Tannich. 1998. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:Flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. Biochem J 1998; 330: 1217-1221.

- Bruchhaus Iris, Brendan J. Loftus, Neil Hall, and Egbert Tannich. 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryot Cel* 2:501-509.
- Bujanover S, Katz U, Bracha R, Mirelman D. 2003. A virulence attenuated amoebapore-less mutant of *Entamoeba histolytica* and its interaction with host cells. *International Journal for Parasitology* 33(14):1655-1663.
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1994;4:412-419.
- Calderón J, Muñoz ML, Acosta HM. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J Exp Med* 151: 184-193.
- Calderón J, Schreiber RD. 1985. Activation of the alternative and classical complement pathway by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 50: 560-565.
- Calderón J. The role of complement in Host Defense Against *Entamoeba histolytica* En: Ravdin J, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 453-463.
- Campbell, D. and Chadee, K. 1997. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis* 175: 1176-1183.

- Campbell D, Mann JB, Chadee K. 2000. A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages. *Eur J Immunol* 30: 423-430.
- Campos Rodriguez R., Díaz gerra O., Barranco T., Isibasi Araujo A., Kumate-Rodriguez J. 1986. Role of IgA in the elimination of amoebal antigens. *Rev Arch Invest Med* 17(4):353-358.
- Cario E and Podolsky D.K. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017.
- Carter E. W. and Kerr D.E. 2003. Optimization of DNA-based Vaccination in Cows Using Green Fluorescent Protein and Protein A as Prelude to Immunization Against Staphylococcal Mastitis. *J Dairy Sci* 86: 1177-1186.
- Carrero JC, Díaz MY, Viveros M, Espinoza B, Acosta E and Ortiz L. 1994. Human Secretory Immunoglobulin A Anti-*Entamoeba histolytica* Antibodies Inhibit Adherence of Amebae to MDCK Cells. *Infection and Immunity* 62(2): 764-767.
- Carrero JC, Petrossian P, Acosta E, Sánchez Zerpa E, Ortiz Ortiz L, Laclette J.P. 2000. Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human esecretory IgA antibodies. *Parasitol Res* 86: 330-334.

- Carrillo-Landell FG, García-Rivera G, Olivera-Flores TJ, Martínez MB, Orozco E, Gómez-Lim MA. 2008. Expression and functional analysis of an *Entamoeba histolytica* truncated adhesin in tomato plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94:1-9.
- Castellanos C, Ramos C, Ortiz Ortiz L. 1989. Effect of gamma interferon on syntheses of ADN and protein by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 57: 2771-2775.
- Chadee K, Meerovitch E. 1984. The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol* 117: 71.
- Chadee K, Meerovitch E. 1985. *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Trop Med Hyg* 34: 238-291.
- Chadee K, Petri WA, Jr, Innes DJ, Ravdin JI. Rat and human colonic mucin bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Inves* 1987; 80: 1245-1254.
- Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB. 1998. Specific immune induction following DNA-based immunization through *in vivo* transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol* 160:5707-5718.
- Cheng XJ, Molly A. Hughes, Christopher D. Huston, Brendan Loftus, Carol A. Gilchrist, Lauren A. Lockhart, Salil Ghosh, Vanessa Miller-Sims, Barbara J. Mann, William A. Petri, JR., and Hiroshi Tachibana. 2001.

- Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motif. *Infect Immun* 69: 5892-5898.
- Cheng XJ, Tsukamoto H, Kaneda Y, Tachibana H. 1998. Identification of the 150-kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. *Parasitol Res* 84:632-639.
- Clark CG and Roger AJ. 1995. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6518-6521.
- Clark CG, Diamond LS. 1991. Ribosomal RNA genes of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 49: 297-302.
- Coelho-Castelo AAM, Santos-Junior RR, Bonato VL, Jamur MC, Oliver C, Silva CL. 2003. B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther* 14:1279-1285.
- Coelho-Castelo AAM, Trombone AP, Rosada RS, Santos RR Jr, Bonato VLD, Sartori A and Silva CL. 2006. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genetic Vaccines and Therapy* 4:1-10.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231-235.

- Dai Y, Roman M, Naviaux RK, Verma IM. 1992. Gene Therapy via primary myoblasts: long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 89:10892-10895.
- Darren C, Gaucher D, Chadee K. 1999. Serum from *Entamoeba histolytica* Infected gerbils selectively suppress T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. J Infect Dis 179:1495-1501.
- Denis M, Chadde K. 1988. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage function in amoebiasis. Infect Immun 56: 3126-3131.
- Denis M and Chadde K. 1988a. Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections. Parasitol Today 4:247-252.
- Denis M, Chadde K. 1989. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. J Leukoc Biol 46:270-274.
- Diamond LS, Clark CG. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 40: 340-344.
- Donnelly JJ, Ulmer JF, Shiver JW, Liu MA. 1997. DNA vaccines. Annu Rev Immunol 15:617-48.
- Dumonteil E, Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario G.M. 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. Vaccine 21(17-18):2161-8.

- Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, and Katiyar SK. 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol* 5:359–367.
- Escandon RC, Garcia Manzo NT, Escobedo PJ, Hernandez Ramos JM, Olvera AJ, and Cabral SJ. 1996. Amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: a present-day public health problem. *Rev Gastroenterol Mex* 61: 378-386.
- Espinosa-Cantellano M and Martinez-Palomo A. 2000. Recent developments in amoebiasis research. *Curr Opin Infect Dis* 13:451-456.
- Feachem RG, Bradley DJ, y Garelick H. Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Waste Water Management. Nueva York: John Wiley & Sons, 1983.
- Flores-Romo L, Bacon KB, Estrada-Garcia T, Shibayama M, Tsutsumi V, Martinez-Palomo A. 1993. A fluorescent-based quantitative adhesion assay to study interaction between *Entamoeba histolytica* and human enterocytes. Effect of pro-inflammatory cytokines. *J Immunol Methods* 166: 243-250.
- Forg P, von Hoegen P, Dalemans W, Schirmacher V. 1998. Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination. *Gene Ther* 5(6):789–797.
- Freitas MAR, Vianna EN, Martins AS, Silva EF, Pesquero JL and Gomes MA. 2004. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. *Parasitology* 128: 625-628.

- García Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. 1999. *Entamoeba histolytica*: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 33: 556-568.
- Gathiram V, Jackson T.F.H.G. 1985. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. *Lancet* 1:719-721.
- Gathiram V, Jackson T.F.H.G. 1987. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 72:669-672.
- Gaucher D, Chadee K. 2003. Prospect for an *Entamoeba histolytica* Gal-lectin based DNA vaccine. *Parasite Immunology* 25:55-58.
- Gaucher D, Chadee K. 2002. Construction and immunogenicity of a codon-optimized *Entamoeba histolytica* Gal-lectin-based DNA vaccine. *Vaccine* 20:3244-3253.
- Ghadirian E, Meerovitch E and Hartman D.F. 1980. Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. *Am J Trop Hyg* 29(5):777-784.
- Ghadirian E, Meerovitch E. 1981. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amebic liver abscess in hamster. *Parasite Immunol* 3: 329-338.
- Ghadirian E, Meerovitch E. 1982. In vitro amebicidal activities of immune cells. *Infect Immun* 36: 243.

- Ghadirian E, Meerovitch E. 1982a. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amoebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 4(4):219-25.
- Ghadirian E, Bout DT. 1988. *In vitro* killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites by interferon-gamma-activated mouse macrophages. *Immunobiology* 176:341-353.
- Ghadirian E, Denis M. 1992. *Entamoeba histolytica* extract and interferon-gamma activation of macrophage-mediated amoebicidal function. *Immunobiology* 185:1-10.
- Ghost PK, Castellanos Barba C, Ortiz Ortiz L. 1995. Intestinal amebiasis: cyclic suppression of the immune response. *Parasitol Res* 81: 205-210.
- Gillin FD & Diamond LS. 1980. Attachment and short-term maintenance of motility and viability of *Entamoeba histolytica* in a defined medium. *J. Protozool.* 27: 220-225.
- Goddard S, Youster J, Morgan E, Adams DH. 2004. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 164:511-519.
- Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 143:83-93.
- Guerran RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, and Mandell GL. 1981a. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 143:83-93.

- Guerrero-Manriquez GG, Sanchez-Ibarra F, Avila EE. 1998. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 106(11):1088-1094.
- Gutiérrez Kobeh L, Cabrera N, Pérez Montfort R. 1997. A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lyses by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol.* 83: 234-241.
- Haque R, Ali IM, Sack RB, Farr BM, Ramakrishnan G, Petri WA Jr. 2001. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 183(12):1787-1793.
- Haque R, Duggal P, Ali IM, Hossain MB, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA Jr. 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children. *J Infect Dis.* 186(4):547-552
- Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Leyerly DM, Petri WA Jr. 1997. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis* 175:734–736.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. 2003. Current concepts: amebiasis. *N Engl J Med* 348:1565–1573.
- Haque R, Mondal D, Shu J, Roy S, Kabir M, Davis AN, Duggal P, and Petri WA Jr. 2007. Correlation of interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 76:340–344.

- Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, Iwabe N, and Miyata T. 1993. Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* 36:380–388.
- Hinkle G, Leipe DD, Nerad TA and Sogin ML. 1994. The unusually long small subunit ribosomal RNA of *Phreatamoeba balamuthi*. *Nucleic Acids Res* 22:465–469.
- Haupt E, Barroso L, Lockhart L, Wright R, Cramer C, Lyerly D and Petri WA. 2004. Prevention of intestinal amebiasis by vaccination with the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Vaccine* 22(5-6):612-618.
- Haupt ER, Glembocki DJ, Obrig TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Wright RL, Seaner RM, Keepers TR, Wilkins TD, Petri WA Jr. 2002. The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cell. *J. Immunol.* 169:4496-4503.
- Hughes MA and Petri WA Jr. 2000. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* 14(3):565-582.
- Huston CD, Haupt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA. 2000. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2:617-625.
- Huston C.D. 2004. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *TRENDS in Parasitology* 20(1): 23-26.

- Isibasi A, Santa Cruz M, Ramirez A, Kumate J. 1982. Immunoquímica de una lipopeptidofosfolglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HK9 cultivados en medio axenico, utilizando el método de fenol aqua. Arch Invest Med 13:51-55.
- Ivory C and Chadee K. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. Genet Vaccines Ther 2(1):17-25.
- Ivory CPA, Keller K and 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 74:528-536.
- Ivory CPA and Chadee K. 2007. Intranasal Immunization with Gal-Inhibitable Lectin plus an Adjuvant of CpG Oligodeoxynucleotides Protects against *Entamoeba histolytica* Challenge. Infect Immun 75(10):4917-4922.
- Jackson TFHG, Gathiram V, Simjee AE. 1985. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. Lancet 1:716-719.
- Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, Leippe M. 1998. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol 27:269-276.
- Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V. 2002. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse.

- Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Parasitol* 101:40-56.
- Joyce MP, Ravdin JI. 1988. Antigen of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patient. *Am J Trop Med Hyg* 38:74-80.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95:55-65.
- Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, Kingham TP, Chaudhry UI, Shah AB, Dematteo RP. 2005. Conventional liver CD4 T cells are functionally distinct and suppressed by environmental factors. *Hepatology* 42:293-300.
- Keeling PJ, Poulsen N, and McFadden GI. 1998. Phylogenetic diversity of parabasalian symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*. *J Eukaryot Microbiol* 45:643-650.
- Keene WE, Petitt MA, Allen S and McKerrow JH. 1986. The major neutral proteinase of *E. histolytica*. *J Exp Med* 163:536-549.
- Kim KH, Shin CO, Im K. 1993. Natural killer cell activity in mice infected with free-living amoeba with reference to their pathogenicity. *Korean J Parasitol* 31:239-248.

- Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272: 31138–31148.
- Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. 1997a. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem*. 272: 1402–1411, 1997.
- Kim JM, Jung HC, Mi KI, Song IS, Kim CY. 1998. Synergy between *Entamoeba histolytica* and *Escherichia coli* in the induction of cytokine gene expression in human colon epithelial cells. *Parasitol Res* 84: 509–512.
- Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. 1999. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 84: 253–256.
- Klinman DM and Currie D. 2003. Hierarchical recognition of CpG motifs in immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Cell Immunol* 133: 227–232.
- Koshkina NV, Agoulnik SL, Densmore CL. 2003. Biodistribution and Pharmacokinetics of Aerosol and intravenously administered DNA polyethyleneimine complexes: Optimization of Pulmonary Delivery and Retention. *Mol Ther* 8:249-254.
- Krieg AM and Davis HL. 2001. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* 3:15–24.
- Kumar S, Epstein JE, Richie TL. Vaccines against asexual stage malaria parasites. *Malaria Immunology*. Perlmann P, Troye-Blomberg M,

- editors. *Malaria Immunology*. Chem Immunol. Basel, Karger, 2002; 80:262-286.
- La Cava A, Billetta R, Gaietta G, Bonnin DB, Baird SM, Albani S. 2000. Cell-mediated DNA transport between distant inflammatory sites following intradermal DNA immunization in the presence of adjuvant. *J Immunol* 164(3):1340-1345.
- Lacour M, Arrighi JF, Muller KM, Carlberg C, Sauret JH, Hauser C. 1994. cAMP up-regulates IL-4 and IL-5 production from activated CD4+ T cell while decreasing IL-2 release and NF-AT induction. *Int. Immunol* 6:1333-1343.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*. 277:680-685.
- Lamm ME, Nedrud JG, Kaetzel CS, Mazanec MB. 1995. IgA and mucosal defense. *APMIS* 103(4):241-6.
- Leitner WW, Seguin MC, Ballou WR, Seitz JP, Schultz AM, Sheehy MJ, Lyon J. 1997. Immune response induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites. *J of Immunol*. 159:6112-6119.
- Leippe M and Muller-Eberhard HJ. 1994. The pore forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* 87: 5-18.

- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD and Muller-Eberhard HJ. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:7659-7663.
- Leyva GR, Ramos PR, Mlendo EI, Ximenes C. 1992. Inhibition of the adhesion process mediated by anti-*E. histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. Arch Med Res 23:227-229.
- Li E, Becker A and Stanley SL. 1989. Chinese hamster ovary cells deficient in N-acetylglucosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica* mediated cytotoxicity. Infect Immun 57:8-12.
- Li E, WG Yang, T Zhang and SL Stanley Jr. 1995. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteases and its effect on amebic pathogenesis. Infect Immun 63: 4150-4153.
- Lin JY, Chadee K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. J. Immunol 148: 3999-4005.
- Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. 1994. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. Infect Immun 62:1534-1541.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berriman M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z,

- Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail MA, Rabbinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillén N, Gilchrist C, Stroup SE, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NM, Petri WA Jr, Clark CG, Embley TM, Barrell B, Fraser CM & Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865-868.
- Lotter H, Zhang T, Seydel KB, Stanley SL, Tannich E. 1997. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med* 185:1793-1801.
- Lotter H, Khajawa F, Stanley SL Jr, Tannich E. 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): 4416-4421.
- Lotter H, Jacobs T, Gaworski I and Tannich E. 2006. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 74: 118-124.
- Lotter Hannelore and Egbert Tannich. 2006a. The Current Status of an Amebiasis Vaccine. *Archives of Medical Research* 37: 292-296.
- Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269-271.

- Lundell D, Lunn C, Dalgarno D, Fossetta J, Greenberg R, Reim R. 1991. The carboxyl-terminal region of human interferon gamma is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis. *Protein Eng* 4(3):335-341.
- Lushbaugh, W.B. y Miller, J.H. The morphology of *Entamoeba histolytica*. . En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 41-89.
- Maeda S, Ohmori K, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. 2004. Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. *J Vet Med Sci* 66(3):337-339.
- Mai, Z., S. Ghosh, M. Frisardi, B. Rosenthal, R. Rogers, and J. Samuelson. 1999. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("Crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 19:2198-2205.
- Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios-Sarabia N, Espinosa-Cantellano M, Becker I, Estrada I, Salazar-Gonzalez RM, Lopez-Macias C, Wagner H, Sanchez J, Isibasi A. 2005. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol* 27(4):127-137.
- Mann BJ, Chung CY, Dodson JM, Ashley LS, Braga LL, Snodgrass TL. 1993. Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba*

- histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kilodalton subunit. *Infect Immun* 61(5):1772-1778.
- Marinets A, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL Jr., Duchene M. 1997. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 186:1557-1565.
- Martinez-Lopez C, Orozco E, Sanchez T, Garcia-Perez RM, Hernandez-Hernandez F & Rodriguez MA. 2004. The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol* 6: 367-376.
- Martinez-Palomo A. 1986. Biology of *Entamoeba histolytica*. Pp. 11-43 in A. Martínez-Palomo, ed. *Amebiasis*. Elsevier, Amsterdam.
- Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today* 3(4): 111-118.
- McGhee J. R., Mestecky J., Dertzbaugh T., Eldridge J. H., Hirasawa J.H., and Kiyona H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10:75-88.
- Meerovitch E, Hartmann DP, Gadhirian E. 1978. Protective immunity and possible regulation in amebiasis. *Arch Invest Med (Mex)* 9 (Supl 1): 247.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL. 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of

- cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66(5):2135–2142.
- Melzer H, Fortugno P, Mansouri E, Felici F, Marinets A, Wiedermann G, Kollaritsch H, Von Specht BU, Duchene M. 2002. Antigenicity and immunogenicity of phage library-selected peptide mimics of the major surface teichoic acid antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 24(6):321–328.
- Melzer H, Baier K, Felici F, von Specht BU, Wiedermann G, Kollaritsch H, Wiedermann U, Duchene M. 2003. Humoral immune response against teichoic acid surface antigens of *Entamoeba histolytica* elicited by immunization with synthetic mimotope peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37(2–3):179–183.
- Meza I, Torres-Guerrero HK, Mraz MA. 1990. Molecular organization of *Entamoeba histolytica*. In *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*. Krestchmer R, Ed., Boca Raton, F.L: CRC Press, pp. 123.
- Meza, I. 1992. *Entamoeba histolytica*: phylogenetic considerations. A review. *Arch. Med. Res.* 23:1–5.
- Moncada D, Keller K, Chadee K. 2003. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect. Immun.* 71(2): 838-844.
- Moody S, Becker S, Nuchamowitz Y and Mirelman D. 1998. Identification of significant variation in the composition of lipoteichoic acid-like

- moleculas of *E. histolytica* and *E. dispar*. *J Eukaryot Microbiol* 45:9s-12s.
- Morales-Espinoza EM, Sanchez-Perez HJ, Garcia-Gil MM, Vargas-Morales G, Mendez-Sanchez JD, Perez-Ramirez M. 2003. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex.* 45:379-388.
- Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146.
- Myung K, Burch D, Jackson TFHG, Stanley SL. 1992. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. *Arch Med Res* 23:285-288.
- Nagata T, Aoshi T, Uchima M, Suzuki M, Koide Y. 2004. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper-T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol* 23:93-106.
- Ocádiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas L. I, Ortega-López J, García-Pérez R.M, Tomas Sánchez T, Castillo-Juárez B.A, Guillermina García-Rivera G, Rodríguez M.A. 2005. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology* 7(2): 221-232.
- Oh YK, Kim J-P, Yoon H. 2001. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther* 8:1587-1592.

- OMS. Amoebiasis - an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril 1997.
- Orozco E, Rodríguez MA, Baez Camargo, M, Riverón A. Biología Molecular de *Entamoeba histolytica*. En: Orozco, E y Gariglio P, eds. Genética y Biología Molecular. México DF: Limusa Noriega, 2000: 267-281.
- Ortiz-Ortiz L, Zamacona G, Sepúlveda B, and Capin N.R. 1975. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4:127-134.
- Ortiz-Ortiz L. 1994. Parasitic infections and the immune system. En: Amebiasis. Kierszenbaum, F. ed. Ac. Press, San Diego, CA. pp. 145-162
- Ortiz-Ortiz L, Mora N, Zambrano-Villa SA, Carrero JC, Sanchez-Zerpa M, Osuna A, Rosales-Borjas DM. 1998. Secretory immune response in patient with intestinal amoebiasis. Parasite Immunol. 20(10):503-507.
- Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, and Mirelman D. 1999. Down Regulation of *Entamoeba histolytica* Virulence by Monoxenic Cultivation with *Escherichia coli* O55 Is Related to a Decrease in Expression of the Light (35-Kilodalton) Subunit of the Gal/GalNAc Lectin. Infection and Immunity 67(5):2096-2102.
- Pan American Health Organization. Mexico. In: PAHO, ed. Health in the Americas. Washington, DC: 1998. pp. 357-358.
- Parker SE, Borellini F, Wenk ML. 1999. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. Hum. Gene Ther. 10: 741-758.

- Pérez-Tamayo R. 1986. Pathology of amebiasis. En: Amebiasis. Martínez Palomo, ed. Elsevier, Amsterdam. pp 45-94.
- Petri, W.A. et al. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 80:1238-1244.
- Petri WA, Ravdin JI. In vitro models of amebic patogénesis. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 191-204.
- Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, Mirelman D. 1990. Pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. Infect Immun 58: 1802-1806.
- Petri WA, Ravdin JI. 1991. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 59:97-101.
- Petri WA Jr., Haque R, Mann BJ. 2002. The bitter sweet interface of parasite and host: lactin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *E. histolytica*. Ann. Rev. Microbiol. 56:39-64.
- Pham VL, Duong MH, Pham NH. 1996. Amebic abscess of the liver: ultrasound guided puncture. Ann Chir 50(4):340-343.

- Pillai D.R, Kobayashi S. and Kain K.C. 2001. *Entamoeba dispar*. molecular characterization of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. *Exp. Parasitol.* 99:226-234.
- Pineiro SMB, Maciel RF, Morais MA Jr, Aca IS, Carvalho LB Jr, Coimbra MRM. 2005. Genetic characterization of *Entamoeba dispar* isolates in Northern Brazil. *Acta Trop* 89:35-40.
- Pumarola A, Rodríguez A, García J, Piedrola A. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2a Ed. Edit. Científica y técnica, S.A. Barcelona, España 1991.p 915.
- Que X. and Reed S. L. 2000. Cysteine proteases and the pathogenesis of amoebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:196-206.
- Que Xuchu, Soo-Hyun Kim, Mohammed Sajid, Lars Eckmann, Charles A. Dinarello, James H. McKerrow, and Sharon L. Reed. 2003. A surface amebic cyteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infect Immun* 71: 1274-1280.
- Ramírez-Emiliano J, González-Hernande A, Arias-Negrete S. 2005. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the develop-ment of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*. *Curr Microbiol* 50: 299-308.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García de León MC, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. 2005. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 73: 87-91.

- Ravdin JI, Guerrant RL. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* 68: 1305-1313.
- Ravdin JI, Petri Jr. WA, Mirelman D. Mechanisms of adherence by *Entamoeba histolytica*. In: Amibiasis. Human infection by *Enatamoeba histolytica*. J.I. Ravdin (ed). John Wiley & Sons. USA. 1988.
- Ravdin JI. 1989. *Entamoeba histolytica*: from Adherence to Enteropathy. *J Infect Dis* 159: 420-429.
- Ravdin JI, Jackson TF, Petri WA Jr, Murphy CF, Ungar BL, Gathiram V, Skilogiannis J, Simjee AE. 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 162:768-772.
- Ravdin JI, Kelsall BL. 1994. Role of mucosal secretory immunity in the development of an amoebiasis vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 50(5 Suppl):36-41.
- Ravdin, J. I. 1995. State of the art clinical article. *Clin Infect Dis* 20,1453-1466.
- Ravi VV, Mithal S, Malavinya AN, Tandon BN.1980. Immunologic studies in amebic liver abscess. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 300.
- Ravilin JP, Jackson TFHG, Petri WA, Murphy CF, Ungar RBLP, Gathiram V, Skilogiannis J, Simjee AE. 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infect Dis* 162:768-772.

- Reed SL, Keene WE and McKerrow JH. 1989. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 27: 2772-2777.
- Reed SL, JA Ember, DS Herdman, RG DiScipio, TE Hugli and I Gigli. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a y C5a. J. Immunol. 155: 266-274.
- Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenes J and Kretschmer R. 2000. The effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon nitric oxide production by human leukocytes. Arch Med Res 31: S90-S91.
- Robinson HL, Boyle CA, Feltquate DM, Morin MJ, Santoro JC, Webster RG. 1997. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein-expressing DNAs. J Infect Dis 176:S50-55.
- Romani L, Puccetti P, Bistoni F. 1997. Interleukin-12 in infectious diseases. Clin Microbiol Rev 10: 611-636.
- Romero JL, Descoteaux S, Reed S, Orozco E, Santos J, Samuelson J. 1992. Use of polymerase chains reaction and non-radioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. Arch Med Res 23:277-279.
- Rosales Encina JL, Meza I, López de León A, Talamas Rohana P, Rojkind M. Isolation of a 220 kilodalton protein with lectin properties from a

- virulent strain of *Entamoeba histolytica*. J infect Dis 1987; 156: 790-797.
- Rothel JS , Boyle DB, Both GW, Pye AD , Waterkeyn JG , Wood PR, Lightowlers MW . 1997. Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep . Parasite Immunol 19(5) :221 - 227.
- Ryan ET, Butterson JR, Zhang T, Baker MA, Stanley SL Jr, Calderwood SB. 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):3118-3125.
- Salata RA, Cox JG, Ravdin JI. 1984. The killing of virulent *Entamoeba histolytica* by cytotoxic T lymphocytes. Clin Res 32: 365.
- Salata RA, Pearson RP, Murphy CF, Ravdin JI. 1985. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent ameba by the activated macrophage: J Clin Invest 76:491.
- Salata RA, Ravdin JI. 1985a. N- Acetyl D-galactosamine- inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. Parasite Immuno. 9: 249-261.

- Salata RA and Ravdin JI. 1986. The interaction of human polymorphonuclear neutrophils and *Entamoeba histolytica*: increase cytopathogenicity for liver cell monolayers. J infect Dis 154: 19.
- Salata RA, Martinez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Trevino N, Segovia E, Murphy CF and Ravdin JI. 1986a. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune response effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. J Immunol 136(7):2633-2639.
- Salata RA, Ravdin JI. Immunoprophylaxis. In Amebiasis: Human Infection by *Entamoeba histolytica*, ed. Ravdin JI. New York: John Wiley and Sons; 1988: 785-792.
- Salata RA, Martínez Palomo A, Canales L, Murray HW, Trevino N, Ravdin JI. 1990. Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. Infect Immun 58: 3941-3946.
- Sargeant PG, Williams JE, Greene JD. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:519-521.
- Sargeant PG, Williams JE. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. Trans R Soc Trop Med Hyg 73: 225-7.
- Sargeant PG, Jackson TFHG, Simjee AE. 1982. Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. Lancet 1:1386-1388.

- Schain DC, Salata RA, Ravdin JI. 1992. Human T lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactosa inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 60:2143- 2146.
- Schain DC, Salata RA, Ravdin JI. 1995. Development of amebicidal cell mediated immunity in gerbils (*Meriones unguiculatus*) immunized with the the galactosa inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 81: 563- 568.
- Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol.* 9:91-120.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Información Epidemiológica de Morbilidad; 2003.
- Sedgwick JD and Holt PG. 1985. Induction of IgE-secreting cells and IgE isotype specific suppressor T cells in the respiratory lymph nodes of rats in response to antigen. *Cell Immunol* 94: 182-194.
- Séguin R, Chadee, K. 1992. *Entamoeba histolytica* modulates TNF α , IL-1 α/β and c-fos Gene Expression in Macrophages. *Arch Med Res* 23:147-149.
- Séguin R, Mann JB, Keller K, Chadee K. 1995. Identification of the galactose-adherence lectinepitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor- α production by macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 92: 12175-12179.

- Seguin R, Mann BJ, Keller K and Chadee K. 1997. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun* 65: 2522–2527.
- Sepulveda, B. 1982. Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev Infect Dis* 4: 1247-1253.
- Seydel KB, Zhang T, Stanley SL. 1997. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscess in SCID mice. *Infect Immun* 65:3951–3953.
- Seydel KB, Li E, Zhang Z, Stanley SL Jr. 1998. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. *Gastroenterology* 115(6): 1446-1453.
- Seydel KB and Stanley SL, Jr. 1998a. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun* 66:2980-2983.
- Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL. 2000. Innate Immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun* 68:400–402.
- Shirakura, T., T. Hashimoto, Y. Nakamura, T. Kamaishi, Y. Cao, J. Adachi, M. Hasegawa, A. Yamamoto, and N. Goto. 1994. Phylogenetic place of a

- mitochondria-lacking protozoan, *Entamoeba histolytica*, inferred from amino acid sequences of elongation factor II. *Jpn J Genet* 69:119–135.
- Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151–161.
- Silberman JD, Clark CG, and Sogin ML. 1996. *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* 76: 311–314.
- Siman-Tov R, Ankri S. 2003. Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 89:146–149.
- Smirnov A, Nasonova E, Berney C, Fahrni J, Bolivar I, Pawlowski J. 2005. Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae. *Protist* 156(2):129–42.
- Snow MJ and Stanley SL Jr. 2006. Recent Progress in Vaccines for Amebiasis. *Archives of Medical Research* 37:280–287.
- Sogin ML, and Silberman JD. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* 28:11–20.
- Soong CJG, Torian BE, Abd-Alla MD, Jackson TFHG, Gathiram V, Ravdin JI. 1995. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun* 63(2):472–477.

- Soong CJG, Kain KC, Abd-Alla M, Jackson TFHG, Ravdin JI. 1995a. 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. *Journal of infectious diseases* 171(3):645-651.
- Stanley SL, Becker A, Kunz Jenkins C, Foster L, Ellen Li. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4976-4980.
- Stanley SL Jr, Huizenga H, Li E. 1992. Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 50:127-138.
- Stanley SL, Blanchard JL, Johnson N, Foster L, Kunz-Jenkins C, Zhang T, Tian K, Cogswell FB. 1995. Immunogenicity of the recombinant serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in African Green Monkey. *Vaccine* 13:947-951.
- Stanley SL Jr, Tian K, Koester JP, Li E. 1995a. The serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) residues. *J Biol Chem* 270:4121-4126.
- Stanley SL Jr. 1997. Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 10(4):637-649.

- Stanley SL Jr. 2001. Protective immunity to amebiasis: new insights and new challenges. *J Infect Dis* 184(4):504-506.
- Stanley SL. 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361:1025-1034.
- Sultan F, Jin L, Jobling MG, Holmes RK, Stanley SL Jr. 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* 66:462-468.
- Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Oppenheim JJ, Wang JM. 2001. The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific IG production in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:971-976.
- Tanimoto-Weki M, Vázquez-Saavedra JA, Calderón-Lara P, Aguirre-García A. 1973. Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amebiano axénico en el hámster. *Arch Invest Med (Mex)* 4:s147.
- Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:5118-5122.
- Tannich E, Burchard GD. 1991. Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J Clin Microbiol* 29: 250-255.
- Thomson AW, Lu L. 1999. Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation. *Transplantation* 68:1-8.

- Thomson AW, Lu L. 1999a. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance?. *Immunol Today* 20:27-32.
- Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E and Bruchhaus I. 2007. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* 8:170-180.
- Tovar J, Fisher A, and Clark CG. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondriate parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 32:1013-1021.
- Towbin, H., Staehelin, T. Y Gordon, G. 1976. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrade IgG and prevents its binding. *J Infec Dis* 177: 508-511.
- Trevino Garcia-Manzo N, Escandon-Romero C, Escobedo PJ, Hernandez-Ramos JM, and Fierro-Hernandez H. 1994. Amebiasis in the epidemiologic transition in Mexico: its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of Social Security. *Arch Med Res* 25: 393-399.
- Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117:81-91.

- Tuomela M, Malm M, Wallen M. 2005. Biodistribution and general safety of naked DNA plasmid GTU® - multiHIV, in a rat, using a quantitative PCR method. *Vaccine* 23:890-896.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 253:1745-1749.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. 2000. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 165:2850-2858.
- Valenzuela O, Ramos F, Moran P, Gonzalez E, Valadez A, Gomez A, Melendro EI, Ramiro M, Munoz O, Ximenez C. 2001. Persistence of secretory antiamebic antibodies in patients with past invasive intestinal or hepatic amoebiasis. *Parasitol Res* 87(10):849-52.
- Velazquez C, Shibayama Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J. 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol.* 20 :225-262.
- Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, and Verschueren H. 2000. DNA Vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice Infect Immun. 68(1): 38-45.

- Vohra H, Kaur S, Ganguly NK, Manhajan RC. 1992. Inhibition of adhesion by monoclonal antibody to 66 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res. (Mex) 23: 235-23.
- Walsh J.A. 1986. Amebiasis in the world. Arch Invest Med 17(Supl):385-389.
- Wang L, Calderon J, Stanley SL Jr. 1997. Short Report: Identification of B Cell Epitopes in the Serine-Rich *Entamoeba histolytica* Protein. Am J Trop Med Hyg 57(6):723-726.
- Wang W, Chadee K. 1992. *Entamoeba histolytica* alters arachidonic acid metabolism in macrophages *in vitro* and *in vivo*. Immunology 76: 242-250.
- Wang W, Keller K and Chadee K. 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoeba and tumour cells. Immunology 83: 601-610.
- Wang W and Chadee K. 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. Infect Immun 63: 1089-1094.
- WHO BULLETIN. 1969. Amoebiasis. Geneva report of a W.H.O. Expert Committe. Expert Committe. W.H.O. Tech. Rep.Ser., No. 421.
- Willhoeft U, Hamann L. and Tannich E. 1999. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba*

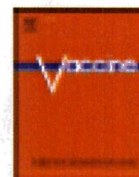
- histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. Infect Immun 67: 5925-5929.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. Hum Mol Gene 1:363-369.
- World Health Organization. Amoebiasis. WHO Weekly Epidemiol Rec 1997; 72:97-100.
- Wu CCN, Lee J, Raz E, Corr M, and Carson D. 2004. Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation. J Biol Chem 279 33071-33078.
- Ximénez C. Las parasitosis intestinales en México. In: Mexico, DF: Cuadernos FunSalud, No. 36. Fundación Mexicana para la Salud; 2002.
- Ximénez Cecilia. 2006 Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A Molecular Approach. Archives of Medical Research 37 : 263-265.
- Xochil Madriz, Máximo B. Martínez, Mario A. Rodríguez, Gustavo Sierra, Carolina Martínez-López, Ana M. Riverón, Leopoldo Flores and Esther Orozco. 2004. Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. Microbiology 150: 1251-1260
- Ye S and Goldsmith E.J. 2001. Serpins and other covalent protease inhibitors. Curr Opin Struct Biol 11:740-745.
- Zaman-Vigar C. 1979. Atlas of Medical parasitology. American, de. USA, pp 234.

- Zarembek KA, Godowski PJ. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.
- Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 62:1166-1170.
- Zhang T, Cieslak PR, Foster L, Kunz-Jenkins C, Stanley SL. 1994a. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunol* 16:225-230.
- Zhang T, Stanley SL. 1994b. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant protein derived from the 170-kilodalton surface adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 62:2605-2608.
- Zhang T, Li E, Stanley S Jr. 1995. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serin-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infect Immun* 63:1349-1355.
- 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):1526-1531.

- Zhang T, Stanley SL Jr. 2000a. DNA vaccination with the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine* 18:868-874.
- Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. 2004. Expression of Amoebapores Is Required for Full Expression of *Entamoeba histolytica* Virulence in Amebic Liver Abscess but Is Not Necessary for the Induction of Inflammation or Tissue Damage in Amebic Colitis. *Infect Immun* 72(2):678-683.
- Zhang Y , Taylor MG, Johansen MV , Bickle QD . 2001. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against *Schistosoma japonicum* infection . *Vaccine* 20(5 -6) :724 - 30 .
- Zhang Zhi, Le Yan, Lei Wang, Karl B. Seydel, Ellen Li, Serge Ankri, David Mirelman and Samuel L. Stanley Jr. 2000. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 β convertin enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol.* 37: 542-548.
- Zhang Z, Duchêne M, Stanley SL Jr. 2002. A Monoclonal Antibody to the Amebic Lipophosphoglycan-Proteophosphoglycan Antigens Can Prevent Disease in Human Intestinal Xenografts Infected with *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 70(10): 5873-5876.

Zhao W, Valencia AZ, Melby PC. 2006. Biological activity of hamster interferon-gamma is modulated by the carboxyl-terminal tail. *Cytokine* 34:243-251.

Zuo X and Coombs G.H. 1995. Amino acid consumption by the parasitic, amoeboid protists *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *FEMS Microbiol Lett* 130:253-258.



A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver

Máximo B. Martínez^a, Mario A. Rodríguez^b, Guillermina García-Rivera^b, Tomás Sánchez^b, Rogelio Hernández-Pando^c, Diana Aguilar^c, Esther Orozco^{b,*}

^a Programa en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Colonia Del Valle, México D.F., 03100, México

^b Departamento de Infección y Patógenos Moleculares, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, A.P. 14-740, México D.F., 07000, México

^c Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México D.F., 14000, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2008

Received in revised form 18 April 2009

Accepted 20 April 2009

Available online 9 May 2009

Keywords:

Amoebiasis

Entamoeba histolytica

DNA vaccine

Gene expression

ABSTRACT

DNA vaccines are promising tools to fight parasitic diseases, including amoebiasis caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*. Here we studied the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine against this parasite composed by the EhCPADH surface complex encoding genes (EhCP112 and EhADH112). EhCPADH is formed by an adhesin (EhADH112) and a cysteine proteinase (EhCP112), both involved in the parasite virulence. We evaluated transcription, protein expression, immunological response and protection against hepatic amoebiasis in hamsters intradermally and intramuscularly immunized with a mixture of pcDNA-EhADH112 and pcDNA-EhCP112 plasmids. RT-PCR and immunohistochemical assays showed that both antigens were differentially expressed in spleen and liver of immunized animals. No significant antibody immune response was induced by either route. However, intradermally inoculated hamsters presented a robust Th1-like immune response, characterized by high levels of INF- γ and TNF- α cytokines, detected in the liver of animals challenged with virulent trophozoites. Animals showed significant protection against amoebiasis manifested by a higher survival rate and a significant prevention of liver abscess formation. We conclude that a refinement of this DNA vaccine could be a good choice to control hepatic amoebiasis.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Entamoeba histolytica is a worldwide distributed protozoan responsible of human amoebiasis. Although there is effective chemotherapy against amoebiasis, in many countries this parasitosis has a high prevalence [1–3]. Throughout the world, 40 million individuals are affected by amoebiasis, and around 100,000 die due to this parasite every year [4].

Different experimental approaches have been developed [5–10] against amoebiasis including DNA vaccines [11–13], but up to now, an efficient vaccine is not available. Passive antibodies transferring to SCID mice suggested that specific antibodies are important effectors in the infection control [14,15]. Nevertheless, other experiments indicated that the presence of specific IgG in serum correlates with an increased susceptibility to infection by *E. histolytica* [16,17]. Thus, the role of systemic humoral response to invasive amoebiasis is yet unclear.

On the other hand, several studies have shown that Th1 immune response is involved in host defense against *E. histolytica* infection

[18]. In support of this hypothesis, there are results showing that in mice, Th2 cytokines depletion decreases the severity of colitis caused by amoebae [19], and that innate immunity is important to control amoebiasis [20,21]. However, we still do not know certainly which branch of the immune response has the central role in protection against *E. histolytica* infection.

In addition, many studies have indicated that the type of immune response and the level of protection are influenced by the route of inoculation [22]. Furthermore, experimental variables, such as antigen nature, antigen dose, booster times and inoculation routes, among others, need to be tested for each antigen.

EhCPADH is a surface and vacuolar heterodimeric *E. histolytica* complex formed by a cysteine protease (EhCP112, 446 amino acids) and an adhesin (EhADH112, 687 amino acids) [23], involved in adhesion, cytopathic effect and phagocytosis [23–26]. Recombinant EhCP112 polypeptide (rEhCP112) is recognized by human antibodies from patients with amoebiasis [27]. Furthermore, rEhCP112 digests *in vitro* gelatin, type I collagen, fibronectin and haemoglobin. In addition, it binds to red blood cells and destroys MDCK cell monolayers [27]. Whereas, the EhADH112 protein has a cell adhesion domain at its carboxy-terminal [23,25], and a Bro-1 domain at its amino-terminal region [28]. Thus, this protein could have a double function in trophozoites [28]. Interestingly, the subcutaneous

* Corresponding author. Tel.: +52 55 57471800x5642.
E-mail address: esther@ciqinvestav.mx (E. Orozco).

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 29 de julio del 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Máximo Berto Martínez Benitez.

Dra. María Esther Orozco Orozco

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dr. Mario César López Camarillo

Dr. Mauricio Castañón Arreola



EL ARTE DE ENCUADERNAR

TESIS URGENTES EN 8Hrs



**AV. IPN No 1891
COL. LINDAVISTA
DEL. G.A.M.
TEL. 5754-3924
NEXTEL. 1089-0507**

**HDA. ZOTOLUCA No 9
ESQ. RANCHO SECO
EDO. DE MEX.
COL. IMPULSORA
TEL. 5712-0055**



NEXTEL. 1089-0506