

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS Th1 EN EL
COMPLEJO EhCPADH 112 DE *Entamoeba histolytica***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
PRESENTA
QBP. JONNATAN PAIS MORALES

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MA. ESTHER OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F.

Marzo 2008

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.

El presente trabajo, se realizó en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en el Posgrado en Ciencias Genómicas y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco.

TUTORA

Dra. Ma. Esther Orozco Orozco
Investigadora del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional.
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal
Investigadora de la Unidad de investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y
Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

Dr. Mario Cesar López Camarillo
Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Máximo Berto Martínez Benítez
Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por la formación académica y el apoyo económico.

Al CINVESTAV-IPN por las facilidades otorgadas para realizar la parte experimental del presente trabajo.

A mi directora de Tesis que dedicó parte de su valioso tiempo para revisar y apoyar este proyecto.

A mis asesores por su apoyo, asesoría y paciencia que me brindaron.

Al M. en C. Máximo Berto Martínez Benítez, por haber sido guía en este trabajo, compartiendo conocimientos y experiencia, así como por su gran ayuda invaluable.

A la Dra. Guillermina García por todas las facilidades y disposición para proporcionarme reactivos y material, sobre todo por su amistad.

A Doña Ale por su trabajo que realiza y por su amistad

A la Dra. Minerva Camacho por sus consejos y ayuda.

A mis padres por apoyarme en todo momento

A mis amigos del laboratorio 2 del departamento de Patología Experimental del CINVESTAV: Tomás Sánchez, Israel López, Cecilia Bañuelos, Silvia Castellanos, Mónica, Mercedes y Andrés

A mis amigos y compañeros de la UACM:

Eduardo Flores, Ma. Esther Herrera, Olga, Itzel, Jacqueline, Areli, Sergio, Omar, Alfredo y Jorge.

Y a los otros amigos que me faltaron en especial a Alicia López
.....

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

Resumen

1. Antecedentes	1
1.1. Clasificación de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.2. Epidemiología de la amibiasis	2
1.3. Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.3.1 Trofozoíto	3
1.3.2. Prequiste	4
1.3.3. Quiste.	4
1.4. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	4
1.5. Patología de la amibiasis	7
1.5.1. Amibiasis intestinal	7
1.5.2 Amibiasis hepática	7
1.6 Genómica de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
1.7. Tratamiento contra la amibiasis	9
1.8. Factores del huésped que interactúan en la defensa contra la	
amibiasis	11
1.8.1. Respuesta inmune innata	11
1.8.2. Respuesta inmune humoral	14
1.8.3. Respuesta inmune celular	14
1.9. Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y	
algoritmos de predicción	16
1.9.1 Sistema de predicción de unión al MHC	19
1.9.1.1. Similitud de secuencia	19
1.9.1.2. Motivos de unión	20
1.9.1.3. Matrices cuantitativas	20
1.9.1.4. Redes Neurales Artificiales	22
1.9.1.5. Modelo oculto de Markov	23

1.10. Vacunas en desarrollo contra la amibiasis	23
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivo General	29
5. Objetivos Particulares	30
6. Materiales y Métodos	31
6.1 Cepas Bacterianas	31
6.2. Plásmido	31
6.3. Antibióticos	32
6.4. IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido)	32
6.5. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB)	32
6.6. Tritón X-100	33
6.8. Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine)	33
6.9. EDTA	33
6.10. SDS	33
6.11. Regulador TAE (Tris-Acetato EDTA)	33
6.12. Regulador Tris-Glicina SDS	34
6.13. PBS (Solución Reguladora de Fosfatos)	34
6.14. Marcadores de tamaño molecular	35
6.15. Marcadores de peso molecular	35
6.16. Enzimas	35
6.17. Electroforesis de ácidos nucleicos	36
6.18. Predicción de epitopos T mediante Análisis <i>in silico</i>	36
6.19. Diseño y Síntesis de oligos	36
6.20. Ensamble de los genes sintéticos para los poliepítomos de la EhADH112 y EhCP112	37
6.21. Clonación de los genes sintéticos de los poliepítomos T del complejo EhCPADH	40
6.21.1. Purificación del plásmido pGEX-6P-1	40
6.21.2. Digestión de los genes sintéticos de los poliepítomos T	

con enzimas de restricción <i>EcoR</i> I y <i>Xho</i> I.....	40
6.21.3. Ligación de los genes sintéticos de los poliepítopos EhCP112 y EhADH112 digeridos al vector GEX-6P-1.....	40
6.22. Transformación de <i>E. coli</i>	41
6.22.1. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> cepa BL21 (DE3) competentes....	41
6.22.2. Transformación de <i>E. coli</i>	41
6.22.3. Análisis de restricción del DNA plasmídico recombinante	42
6.22.4. Secuenciación de los plásmidos recombinantes	42
6.23. Inducción y purificación de los poliepítopos recombinantes.....	43
6.23.1. Inducción de la expresión de los péptidos recombinates	43
6.23.1. Extracción de los poliepítopos recombinates	43
6.23.2. Inmunodetección	43
6.23.3. Prueba de solubilidad de los poliepítopos recocombinantes	44
6.23.4. Purificación de poliepítopos T recombinantes EhADH112 y EhCP112	45
6.24. Inmunización de los hámsteres con los poliepítopos T recombinantes de las proteínas EhADH112 y EhCP11.....	45
6.25. Evaluación de la respuesta inmune desarrollada por la inmunización de epítopos T recombinantes	46
6.25.1. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	46
6.25.2. Evaluación de la respuesta inmune celular desarrollada por la inmunización de epítopos T recombinantes	46
6.25.2.1. Ensayos de proliferación celular	46
6.25.2.2. Cuantificación del patrón de citocinas por PCR en tiempo real .	47
6.26. Bancos de datos, programas y servidores informáticos	48
6.26.1. Genbank	48
6.26.2. PCR-Oligomaker	49
6.26.3. Propred	49
6.26.4. Blast-P	49

6.26.5. Clustal W	49
7. Resultados	50
7.1 Análisis de predicción en ProPred para la unión de las proteínas EhADH112 y EhCP112 a las moléculas HLA-DR	50
7.2. Identificación de epítomos T promiscuos de las proteínas EhADH112 y EhCP112	56
7.3. Construcción de los genes sintéticos de los poliepítomos EhADH112 y EhCP112	58
7.4. Clonación de los genes sintéticos de los poliepítomos y EhADH112 EhCP112	60
7.5. Secuenciación de los genes sintéticos de los poliepítomos EhCP112 y EhADH112 clonados en el vector pGEX-6P-1	66
7.6. Purificación de los poliepítomos recombinantes	71
7.7. Evaluación de la respuesta inmune humoral	78
7.8. Evaluación de la respuesta inmune celular en los hámsteres inmunizados con los poliepítomos recombinantes.....	81
7.8.1. Evaluación del perfil de citocinas expresadas en esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítomo EhCP112	85
8. Discusión	83
9. Conclusiones	94
10. Perspectivas	95
11. Referencias bibliográficas	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	6
Figura 2. Representación esquemática del vector pGEX-6P-1.....	31
Figura 3. Análisis <i>in silico</i> de epítomos T con un umbral de astringencia de 3% realizado en el programa PROPREP para la proteína EhADH11.....	51
Figura 4. Análisis <i>in silico</i> de epítomos T con un umbral de astringencia de 1% realizado en el programa PROPREP para la proteína EhADH112.....	52
Figura 5. Análisis <i>in silico</i> de epítomos T con un umbral de astringencia de 3% realizado en el programa PROPREP para la proteína EhCP112.....	53
Figura 6. Análisis <i>in silico</i> de epítomos T con un umbral de astringencia de 1% realizado en el programa PROPREP para la proteína EhCP112.....	54
Figura 7. Perfil electroforético de los productos de PCR de los poliepítomos EhADH112 y EhCP112.....	59
Figura 8. Perfil electroforético de la purificación del DNA plásmidico.....	61
Figura 9. Perfil electroforético del análisis de restricción del plásmido pGEX-6P-1	62
Figura 10. Perfil electroforético del análisis de restricción de los genes sintéticos de los poliepítomos EhADH112 y EhCP112.....	63
Figura 11. Perfil electroforético para la cuantificación del plásmido pGEX-6P-1 y genes sintéticos restringidos.....	64
Figura 12. Análisis de restricción de clonas positivas.....	65
Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de DNA del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítomo EhADH112.....	67
Figura 14. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítomo EhADH112.....	68
Figura 15. Alineamiento múltiple de la secuencia de DNA del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítomo EhCP112.....	69
Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítomo EhCP112.....	70

Figura 17. Análisis de inducción de los poliepítopos recombinantes.....	73
Figura 18. Inmunodetección de la etiqueta de GST.....	74
Figura 19. Prueba de solubilidad.....	75
Figura 20. Purificación de la GST por afinidad a glutatión sepharosa.....	76
Figura 21. Purificación de los poliepítopos EhCP112 y EhADH112 por afinidad a glutatión sepharosa.....	77
Figura 22. Respuesta inmune humoral en los hámsteres inmunizados con los poliepítopos EhCP112 y EhADH112.....	79
Figura 23. Respuesta inmune humoral en los hámsteres inmunizados con los poliepítopos EhCP112 y EhADH112 contra péptidos sintéticos.....	80
Figura 24. Respuesta proliferativa de los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítopo recombinante EhCP112.....	88
Figura 25. Respuesta proliferativa de los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítopo recombinante EhADH112.....	84
Figura 26. Perfil de citocinas expresadas en los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítopo recombinante EhCP112.....	86
Figura 27. Perfil de citocinas expresadas en los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítopo recombinante EhADH112.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de <i>Entamoeba histolytica</i>	2
Tabla 2. Esquema de tratamiento.....	10
Tabla 3. Tipos generales de sistemas de predicción para péptidos de unión al MHC.....	19
Tabla 4. Enzimas.....	35
Tabla 5. Oligonucleótidos para el ensamble de los genes sintéticos para los poliepítopos EhADH112 y EhCP112	38
Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación del gen sintético de los poliepítopos EhADH112 y EhCP112.....	39
Tabla 7. Secuencia de iniciadores para secuenciar el plásmido pGEX-6P-1.....	42
Tabla 8. Análisis de predicción en ProPred para la unión de las proteínas EhADH112 y EhCP112 a los HLA-DR.....	55
Tabla 9. Regiones promiscuas de las proteínas EhADH112 y EhCP112.....	57
Tabla 10. Epítopos T de la EhCP112 evaluados en los ensayos de linfoproliferación.....	82
Tabla 11. Epítopos T de la EhADH112 evaluados en los ensayos de Linfoproliferación.....	82

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AHA	Absceso Hepático Amibiano
ANNs	Redes Neurales Artificiales
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
BLAST	Alineamiento de Secuencias Tipo Local
bp	Pares de bases
CamR	Resistencia a cloranfenicol
CHO	Ovarios de Hámster Chino
CpG-ODN	Oligodesoxinucléotidos con Guanina y Citosina
D.O.	Densidad Óptica
DGE	Dirección General de Epidemiología
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EDTA	Etilendiaminotetraacético
g	gravedades
GST	Glutación-S-Transferasa
HLA	Antígeno de leucocitos humanos
HMMs	Modelo Oculto de Markov
IFN- γ	Interferón gamma

IgA	Inmunoglobulina de la clase A
IgG	Inmunoglobulina de la clase G
IgM	Inmunoglobulina de la clase M
IL	Interleucina
<i>iNOS</i>	Oxido nítrico sintasa inducible
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
LPG	Lipofosfoglicana
LPPG	Lipopéptidofosfoglicana
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	miligramo
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
MLIF	Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos
nm	nanometros
PBS	Solución Reguladora de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
pH	Potencial de hidrogeniones
RNI	Especies Reactivas del Nitrógeno
ROI	Especies Reactivas del Oxígeno

rpm	Revoluciones Por Minuto
s	Segundos
SCID	Inmunodeficiencia Severa Combinada
SDS	Duodécil Sulfato de Sodio
srDNA	Subunidad pequeña del Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
TAE	Regulador Tris-Acetato-EDTA
TIGR	El Instituto para la Investigación Genómica
TLR-2	Receptores tipo Toll de la case 2
TLR-4	Receptores tipo Toll de la case 4
TLRs	Receptores tipo Toll
Tm	Temperatura de alineamiento
TNF- α	Factor de necrosis Tumoral tipo alfa
UNESCO	Organización para las naciones unidas para la educación, la ciencia y la cultura
URL	Localizador Uniforme de Recursos
WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

La amibiasis es una amenaza importante para la salud pública en muchos lugares del mundo. En el último reporte generado por la Dirección General de Epidemiología en México señalo que en el 2007 se presentaron 567381 casos de amibiasis intestinal.

El mejoramiento en saneamiento ha logrado casi eliminar la amibiasis en la mayoría de los Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, y Europa, pero el mejoramiento en saneamiento es muy poco probable que sea aplicado para mejorar la salud pública en los países en vías de desarrollo, por lo que dichos países seguirán presentando altos índices de amibiasis. Las vacunas tienen una relación costo-beneficio alto y muchas veces han logrado ser medios exitosos para la prevención e incluso la erradicación de enfermedades. Sin embargo, muchas de las vacunas actuales han sido desarrolladas para un gran número de bacterias y virus, no logrando así hasta la fecha vacunas efectivas contra parásitos protozoarios o helmintos.

El objetivo del presente trabajo fue la identificación de epítomos T del tipo Th1 en el complejo EhCPADH de *Entamoeba histolytica*, debido a que dicha respuesta celular ha sido identificada como la respuesta protectora contra el desarrollo del absceso hepático amibiano. El análisis *in silico* realizado en el programa PROPRED ayudó a la identificación de epítomos T. Posteriormente se crearon genes sintéticos que codificaban para múltiples epítomos T que previamente se habían identificado *in silico*, para las proteínas EhADH112 y EhCP112. Subsecuentemente se clonaron los poliepítomos EhADH112 y EhCP112 en el vector pGEX-6P-1 para transformaron en bacterias *E. coli* B121 plySE para su expresión, los pesos moleculares para los poliepítomos recombinantes fueron de 37 kDa y 36 kDa respectivamente.

Después se purificaron los poliepítomos recombinantes y se inmunizaron hámsteres sirios dorados para la evaluación de la respuesta inmune humoral y celular. La respuesta inmune humoral mostró que el nivel de anticuerpos séricos anti-poliepítomos se comportó con una tendencia creciente en el transcurso de los días y a medida que se iban realizando las inmunizaciones. Por otro lado, la evaluación de la respuesta inmune celular mostró que los 8 epítomos evaluados del complejo EhCPADH presentaron índices de estimulación celular positivos. Así mismo, estos 8 epítomos desarrollaron una respuesta celular del tipo Th1 en los esplenocitos de hámsteres inmunizados con los poliepítomos recombinante EhADH112 y EhCP112.

1. Antecedentes

Entamoeba histolytica fue descubierta por Friedrich Lösch en 1873 en Rusia, quien la aisló de un paciente con disentería e incluso estableció la relación existente entre la enfermedad y la infección en perros infectados experimentalmente con quistes amibianos de humanos (Lösch, 1875). Brumpt en 1925, propuso que existían dos especies distintas, una patógena y una no patógena, aunque fueran morfológicamente iguales.

Sargeaunt diferenció una variante patógena de *E. histolytica* de una no patógena mediante patrones electroforéticos de isoenzimas (Sargeaunt y col., 1978). No fue hasta 1993, cuando Diamond demostró que se trataban de dos especies diferentes *E. histolytica* y *E. dispar* (Diamond, 1993). La OMS en 1997 recomendó que se diferenciaran las dos especies para efectos de diagnóstico y tratamiento, y cuando el diagnóstico se lleve a cabo por microscopía óptica, se reporte como *E. histolytica/dispar* (WHO/PAHO/UNESCO, 1997)

1.1. Clasificación de *Entamoeba histolytica*

Inicialmente se pensaba que *E. histolytica* se había originado de los eucariontes antes de que estos adquirieran mitocondrias y de otros organelos, sin embargo, los estudios filogenéticos basados en la comparación de las secuencias de la subunidad pequeña del ADN ribosomal (srDNA) han establecido que *E. histolytica* pertenece a un linaje relativamente cercano al de los eucariontes actuales (Clark & Roger, 1995).

E. histolytica pertenece al *phylum* de los Rhizopodos cuya característica principal es la presencia de pseudopodos en algún estadio de su vida y la familia de los Entamoebidae cuyos miembros son todos parásitos.

Tabla 1. Clasificación de *Entamoeba histolytica*

Phyllum	Sarcomastigophora
Subphyllum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoeba
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Endamoebidae
Genero y Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

(Levine y col., 1980)

1.2. Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis es una infección humana causada por *E. histolytica*, se presenta prácticamente en todos los países del mundo, siendo más común en países en desarrollo. La amibiasis se relaciona con la pobreza, el suministro inadecuado de agua y contaminación, las malas condiciones sanitarias y el hacinamiento, lo cual favorece la transmisión del parásito de una persona a otra (Espinosa-Castellano & Martinez-Palomo, 2000).

En el mundo existen de 40 a 50 millones de individuos infectados con *E. histolytica* y de éstos cerca de 100,000 mueren anualmente (WHO/PAHO/UNESCO, 1997). En México, en un estudio realizado en la ciudad de Puebla se encontró que el 7 % de los individuos que presentaron síntomas de desorden intestinal estaban infectados con *E. histolytica*. Por otro lado, la prevalencia de este parásito en México puede ser muy alta hasta un 51% como en el caso del estudio

realizado en el estado de Chiapas (Sánchez-Guillén, y col., 2002; Morales-Espinoza, y col., 2003).

El Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica ha reportado que para la semana 52 (del 30 de Diciembre del 2007 al 5 de Enero del 2008), había 567 381 casos acumulados de amibiasis intestinal (DGE. URL: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>).

1.3. Morfología de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales: el trofozoíto, el prequiste y el quiste (Stanley, 2003).

1.3.1 Trofozoíto

El trofozoíto es una célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60 µm de diámetro, con forma irregular y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largos y anchos. En su citoplasma se observa marcada diferencia entre el ectoplasma que es hialino y transparente y el endoplasma que tiene una gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso con aspecto de vidrio molido, características que se acentúan si se usa un microscopio de contraste de fases. En preparaciones frescas y sin teñir es difícil caracterizar a las inclusiones del citoplasma como el núcleo, vacuolas con eritrocitos, bacterias, etc., pero si la preparación se tiñe con hematoxilina férrica, o tinción tricómica de Gomori, entonces se ven claramente las partes de que está constituido el trofozoíto (Stanley, 2003; Tay, y col., 2003).

1.3.2. Prequiste

Presenta un revestimiento de una doble membrana gruesa y refringente, lo cual le confiere resistencia cuando se expone a las condiciones del medio externo al ser expulsado en la materia fecal, el prequiste presenta un solo núcleo, una masa de glucógeno en una vacuola y barras cromatóides (Stanley, 2003).

1.3.3. Quiste.

A medida que el tiempo transcurre, en el interior del prequiste hay una gran actividad, el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del proceso de maduración, el quiste maduro que tiene cuatro núcleos pequeños con características morfológicas iguales a la del trofozoíto, se recubre de una pared refráctil de quitina. Durante la maduración del quiste, desaparece el glucógeno y las barras cromatóides se hacen poco visibles o desaparecen (Stanley, 2003).

1.4. Ciclo biológico de *E. histolytica*

La forma infectante de *E. histolytica* es el quiste, el cual presenta una gran capacidad para permanecer viable hasta por ocho días en heces, en agua o en el suelo a temperatura ambiente; así como de resistir la acción de los jugos gástricos y de otras enzimas digestivas. Los quistes de *E. histolytica* sobreviven a la acción del cloro, a las concentraciones usadas en la potabilización del agua, por lo cual lavar los vegetales con agua clorada no protege contra la infección por quistes de *E. histolytica* (Tay, y col., 2003).

En el intestino delgado ocurre la llamada exquistación, que consiste en la división del quiste tetranucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoítos. Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo mediante el contacto con la mucosa. Los trofozoítos amibianos pueden invadir el intestino y pasar a la circulación, donde por la vía portal llegan al hígado, produciendo un absceso hepático amibiano, por contigüidad puede verse afectado el diafragma y el pulmón. En raras ocasiones puede haber amibiasis en órganos como el cerebro y aparato genitourinario. El trofozoíto generalmente vive en el ciego y rectosigmoideo, donde se multiplica por división binaria. Absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos por sus enzimas citolíticas, e ingiere glóbulos rojos, hemoglobina y sustancias sintetizadas por el hospedero (Tay, y col., 2003).

En condiciones naturales no se produce enquistamiento en los tejidos, sino que a medida que la materia fecal empieza a deshidratarse en la luz del colon, los trofozoítos se desprenden de la mucosa, para posteriormente secretar una cubierta resistente con un solo núcleo, recibiendo el nombre de quiste inmaduro. El quiste inmaduro sufre dos mitosis consecutivas, produciendo así cuatro núcleos y dos tipos de inclusiones alimenticias conocidas como barras cromatoídes y masa de glucógeno. Los quistes salen al exterior con las heces y por condiciones higiénicas deficientes inician un nuevo ciclo (Tay, y col., 2003; Haque, y col., 2003). El ciclo de vida de *E. histolytica* se muestra en la **Figura 1**.

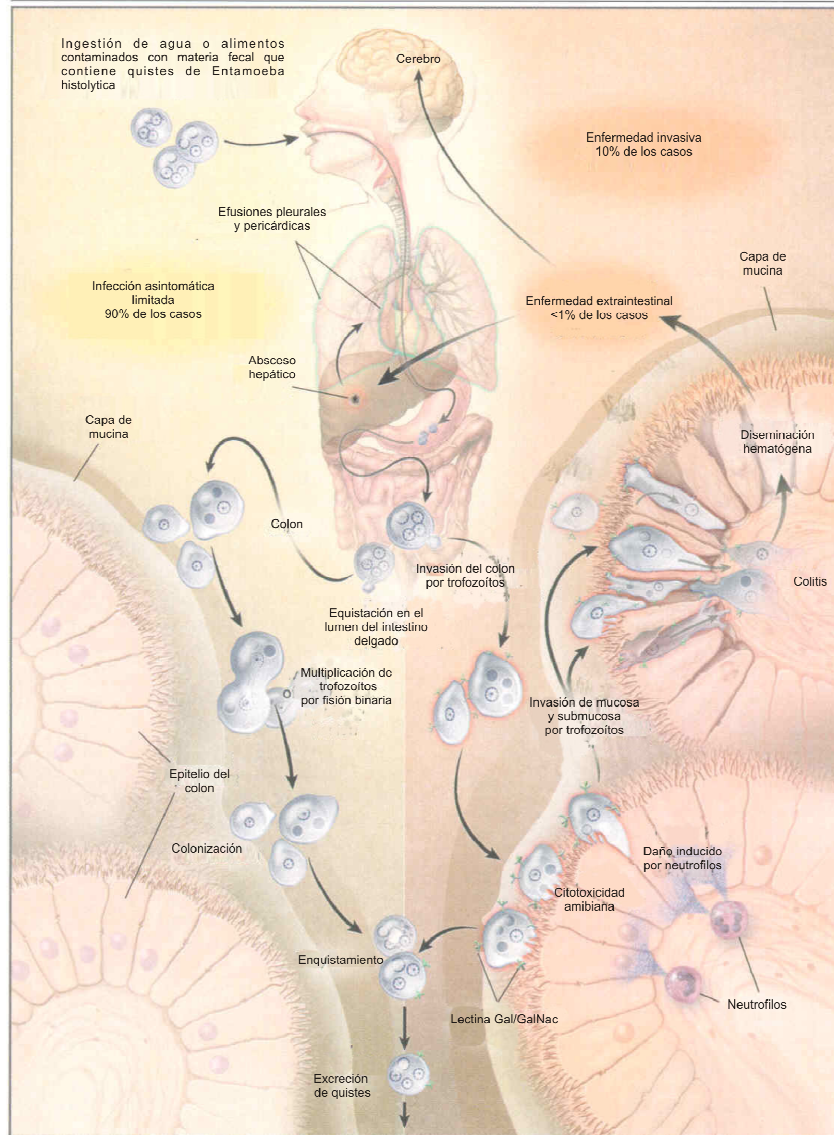


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección por *E. histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros en alimentos, agua o manos contaminados con heces. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de la transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones cerebro etc. (enfermedad extraintestinal). Adaptado de Haque, y col., 2003.

1.5. Patología de la amibiasis

1.5.1. Amibiasis intestinal

La amibiasis intestinal es la forma más frecuente de amibiasis y es perfectamente controlable con una quimioterapia adecuada. Se caracteriza por la presencia de evacuaciones diarreicas, posteriormente evoluciona a síndrome disenteriforme caracterizado por evacuaciones mucosanguinolentas acompañadas de pujo y tenesmos, dolor abdominal que exacerba con la palpación, disentería fulminante, pérdida de peso, deshidratación, astenia, y malestar general (Stanley, 2003).

1.5.2 Amibiasis hepática

La amibiasis hepática o absceso hepático amibiano (AHA) es un síndrome caracterizado por hepatomegalia, abscesos, fiebre, anorexia, náuseas, vómito y diarrea que generalmente incluye dolor abdominal en el hipocondrio derecho y suele presentarse neutrofilia con leucocitosis. (Sepúlveda, 1982).

El AHA se caracteriza por grandes cantidades de trofozoítos amibianos en el hígado, los cuales ingresan por la vena porta a partir de ulceraciones intestinales, dónde aparentemente se induce una pobre respuesta celular. (Martínez-Palomo, 1987).

En la histopatología de animales utilizados como modelo para estudiar el AHA se ha documentado una reacción inflamatoria temprana, donde predominan leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), algunos eosinófilos y escasos monocitos alrededor de las amibas (Tsutsumi y col., 1984; Tsutsumi y col.,1988). En contraste, las lesiones avanzadas encontradas en autopsias no necróticas se observan pocos leucocitos o ninguno (Ravdin, 1995).

1.6 Genómica de *Entamoeba histolytica*

Para obtener la secuencia del genoma de *E. histolytica* colaboraron científicos del TIGR (The Institute for Genomic Research) del Wellcome Trust Sanger Institute, del Reino Unido, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas y Alérgicas de Estados Unidos, entre otros (Loftus, y col., 2005).

La secuencia del genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño de 23 751 pb y alrededor de 9 938 genes, en los cuales se incluye un repertorio complejo de 91 genes similares a los de bacterias situadas en el intestino humano que contribuyen a que tenga una biología en particular. Por lo cual se sugiere que *E. histolytica* pudo haber manipulado aspectos de su metabolismo, perdiendo genes propios de los protozoarios y adquiriendo algunos propios de las bacterias, a través de una transferencia lateral (Loftus, y col., 2005).

El análisis del genoma de *E. histolytica* reveló una probable evolución de un organismo libre a parásito del tracto intestinal humano. Al mismo tiempo, se ha encontrado la presencia y expansión de algunas familias de genes, incluyendo aquellos que se relacionan con la virulencia. Una característica adicional en el genoma de *E. histolytica*, es la abundancia de arreglos repetidos en “tamdem” que contienen RNA de transferencia, los cuales probablemente tengan una función estructural en el genoma (Loftus, y col., 2005).

Se espera que ahora con la secuencia obtenida del genoma ayude a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y de prevención (vacunas) así como pruebas diagnósticas que distingan a las cepas más virulentas (Loftus, y col., 2005).

1.7. Tratamiento y control contra la amibiasis

En ausencia de tratamiento, la amiba es capaz de matar a su hospedero por diversos mecanismos (Martinez-Palomo, 2000). El tratamiento de la infección depende del diagnóstico clínico, por ejemplo los pacientes que presentan un cuadro de colitis amibiana no requiere el mismo tratamiento que un portador asintomático, debido a los sitios de infección y los mecanismos de acción de los medicamentos empleados. Los medicamentos empleados contra la amibiasis suelen dividirse en luminar como; las 8-hidroxiquinolonas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (teclozan, etofamida, quinfamida), o los titulares como; nitroimidazoles (metronidazol, secnidazol, ornidazol). El metronidazol presenta una acción mixta es decir, tanto luminal como tisular (Guerrant, 2001).

Los esquemas de tratamiento se resumen en la **Tabla 2**. Algunos médicos recomiendan el tratamiento de los pacientes asintomáticos como una medida de control de la transmisión. En México se han llevado acabo ensayos de quimioprofilaxis para curar y evitar la reinfección por amibiasis, obteniendo resultados favorables a corto plazo, ya que desafortunadamente cuando se suspende la quimioprofilaxis se vuelve a los mismos índices de infección (Tay, y col., 2003). El tratamiento inadecuado puede favorecer la aparición de resistencia a los medicamentos (Bansal y col, 2006).

En algunos casos de amibiasis se requiere manejo quirúrgico, como en la colitis amibiana fulminante, apendicitis amibiana, la perforación intestinal y el amebota (Haque, y col., 2003).

Alternativas apropiadas para prevenir la amibiasis, así como otras enfermedades gastrointestinales, es la implementación de medidas de saneamiento y medidas higiénicas adecuadas, siendo difíciles de implementar en países en vías de desarrollo (Stanley, 2006). Una posible alternativa para prevenir enfermedades estas enfermedades puede ser la vacunación, la cual tiene una gran relación costo-beneficio. De igual manera la sinergia de la combinación antiparasitarios-vacuna puede investigarse para el control de enfermedades parasitarias (Vercruysse, y col 2007).

Tabla 2. Esquema de tratamiento

Patología	Medicamento	Duración
Portador asintomático	Teclozán, 500 mg	Cada 12 h / 3 dosis
	Etofamida, 500 mg	Cada 12 h / 3 dosis
Colitis amibiana	Metronidazol, 500 mg	Cada 8 h / 7-10 días
	Tinidazol, 2000 mg	Cada 24 h / 2 días
	Secnidazol , 2000 mg	Cada 24 h / 5-7 días
Amibiasis extraintestinal	Metronidazol, 500 mg	Cada 8 h / 10 días
	Tinidazol, 2000 mg	Cada 24 h / 3-5 días
	Secnidazol , 2000 mg	Cada 24 h / 5-7 días

1.8. Factores del hospedero que interactúan en la defensa contra la amibiasis

1.8.1. Respuesta inmune innata

La resistencia inicial a *E. histolytica* depende de los mecanismos de la inmunidad innata, dentro de ellos podrían participar las mucinas del epitelio del colon, las cuales tienen la capacidad de unirse a la lectina Gal/GalNac del parásito, previniendo así la adhesión amibiana y la citólisis de las células CHO (Chinese Hamster Ovary) como lo sucedido en experimentos realizados *in vitro* (Chadee, y col., 1987; Chadee, y col., 1991).

Experimentos *in vitro* han demostrado la actividad citocida del complemento contra *E. histolytica*, sin embargo, los trofozoítos de *E. histolytica* tienen la capacidad de evadir la acción de las proteínas del complemento (Reed & Gigli, 1990).

El complemento constituye un mecanismo contra la amibiasis invasiva, ya que *E. histolytica* la vía alternativa del complemento.

Los mecanismos por los que *E. histolytica* resiste el ataque del complemento no son del todo conocidos. Algunos de ellos pueden que a) la lectina Gal/GalNac tenga una reactividad cruzada con el CD59, la cual es una molécula de superficie que protege a las células del ataque del complemento b) la amiba sintetice una molécula similar al CD59 y c) la amiba incorpore proteínas reguladoras del complemento en la membrana (Braga, y col, 1992; Flores-Romo, y col., 1994; Gutierrez-Kobeh y col., 1997).

Estudios *in vitro* han demostrado que macrófagos que han sido activados por citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ matan a los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos dependientes del óxido nítrico (NO) y por la acción de proteasas. Sin embargo, macrófagos provenientes de

pacientes con AHA son deficientes en su capacidad para inducir al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), desarrollar un estallido respiratorio, así como de expresar y secretar interleucina-1 (IL-1) (Lin, y col., 1994; Wang, y col., 1994; Seguin, y col., 1997; Denis & Chadee, 1988).

Estudios *in vitro* con monocitos aislados de sangre periférica humana, activados con antígenos amibianos, fueron capaces de eliminar más del 40% de los trofozoítos de *E. histolytica* (Seydel, y col., 2000). Sin embargo, en un modelo *in vivo* de amibiasis murina, se encontró que los macrófagos formaban parte del infiltrado inflamatorio, pero no contribuían de manera directa con la eliminación de la infección (Jarrillo-Luna, y col., 2000).

La explicación de este fenómeno puede deberse a la presencia de un pentapéptido anti-inflamatorio, conocido como factor inhibidor de la locomoción de monocitos (MLIF) producido por *E. histolytica*, el cual inhibe la locomoción de monocitos pero no la locomoción de neutrófilos, dicho pentapéptido suprime la producción de especies reactivas intermediarias del oxígeno y nitrógeno (ROI y RNI) en monocitos y neutrófilos (Rico y col., 1992; Rico y col., 2003). Así mismo, éste pentapéptido también disminuye la expresión de algunas quimiocinas involucradas en la quimiotaxis, (Utrera-Barillas, y col, 2003).

Los Receptores Tipo Toll o Toll-Like receptor (TLRs) son una familia de proteínas transmembranales del tipo 1 que forman parte del sistema inmune innato. Estos receptores juegan un papel esencial en el reconocimiento de PAMPs por sus siglas en inglés (Pathogen-Associated Molecular Patterns), en la inducción de genes antimicrobianos y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. La señalización vía TLRs conduce a la activación de genes a través del factor de transcripción NF- κ B para la síntesis de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas

coestimuladoras que participan en la respuesta inmune inicial, la cual determinará la progresión de la inflamación (Akira, y col., 2003).

La lipopéptidofosfoglicana (LPPG) y la lipofosfoglicana (LPG) de *E. histolytica* son moléculas de superficie tipo polisacárido que están expuestas directamente al sistema inmune del hospedero y funcionan como patrones moleculares inmunoestimuladores asociados a patógenos, reconocidos por TLR2 y TLR4. TLR2 y TLR4 inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B y la síntesis del TNF- α , las interleucinas IL-6, IL-8, IL-12p40 e IL-10 (Maldonado-Bernal, y col., 2005)

Grandes concentraciones de LPPG producen una regulación negativa de la transcripción del gen del *TLR2* en monocitos humanos después de 24 horas de incubación en experimentos *in vitro*. La regulación negativa de *TLR2* inducida por el LPPG en monocitos, podría resultar en la supresión de la respuesta inmune, lo cual podría contribuir a la persistencia de *E. histolytica* en el hospedero (Maldonado-Bernal, y col., 2005).

La expresión de TLR2 puede tener un impacto profundo en la activación de los macrófagos, mientras la respuesta inmune permanezca sesgada hacia una respuesta celular de tipo Th1 (Kammanadiminti, y col., 2004).

Por otro lado, la IL-10 inducida por LPPG puede promover una inmunosupresión transitoria que permite la sobrevivencia de los trofozoítos amibianos en el hígado (Maldonado-Bernal, y col., 2005).

1.8.2. Respuesta inmune humoral

La producción de anticuerpos es la principal manifestación inmunológica de la amibiasis intestinal e invasiva en humanos. Después del séptimo día de desarrollo de AHA aparecen en el suero del hospedero títulos elevados de anticuerpos específicos contra amibas, los cuales persisten hasta por diez años en humanos (Ravdin y col, 1990).

En el modelo experimental de ratón, después de la inmunización con una dosis de amibas por vía local y sistémica, se observó que las células esplénicas y las células de las placas de Peyer, producían anticuerpos de los isotipos IgA, IgM e IgG principalmente. Al inmunizar por la vía intragástrica, la respuesta de estas inmunoglobulinas fue superior en células de las placas de Peyer, en relación a las células esplénicas. Cuando la inmunización es por la vía rectal, la respuesta de IgG e IgA es superior en las células esplénicas en contraste a las células de las placas de Peyer, y cuando la inmunización es por la vía intraperitoneal, las IgM e IgG son superiores en esplenocitos y las IgA superior en células de Peyer (Moreno –Fierros y col., 1992).

No existe evidencia de que la amibiasis intestinal ocurra con mayor frecuencia o sea más severa en individuos con deficiencias de IgA. Lo que sí se sabe es que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a las inmunoglobulinas IgA secretora e IgG, rasgo que se interpreta como un mecanismo de defensa del parásito (Kelsall & Ravdin, 1993; Que & Reed, 2000). Por otro lado la presencia de anticuerpos no se asocia con la resistencia a la infección o con inmunidad protectora contra infecciones recurrentes (Krupp & Powell, 1971; Tran, y col., 1998).

1.8.3. Respuesta inmune celular

Los neutrófilos parecen ser importantes en la respuesta inicial y en la resolución de la infección, aunque otros grupos celulares también se han relacionado con la efectiva resolución de la misma. Los macrófagos, por ejemplo, se han asociado con la destrucción directa de los trofozoítos de *E.*

histolytica a través de mecanismos que incluyen la generación de intermediarios de oxígeno (Stanley & Reed, 2001; Espinosa-Castellano & Martinez-Palomo, 2000).

El papel de los neutrófilos en la resolución de la infección por *E. histolytica* fue observado cuando se inoculó amibas directamente en el parénquima hepático de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). En este experimento los neutrófilos fueron bloqueados con los anticuerpos monoclonales RB6-8C5, los resultados mostraron que se presentaba mayor número de abscesos hepáticos en los ratones SCID inoculados con amibas en comparación a los ratones SCID control (Seydel, y col, 1997).

Por otro lado, se ha propuesto que los neutrófilos activados son capaces de actuar eficientemente contra *E. histolytica*. La participación del IFN- γ en la activación de los neutrófilos fue estudiada en un modelo de ratones “knock-out” para la subunidad- α del receptor del IFN- γ . Estos ratones presentaban abscesos hepáticos más grandes y en mayor número que los ratones normales (Seydel, y col, 2000). Además, los neutrófilos activados son capaces de eliminar a los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos como la producción de óxido nítrico y otros intermediarios del oxígeno. En un modelo murino, en el cual el gen para la óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*) no se expresa, los abscesos hepáticos fueron de mayor tamaño que los observados en ratones normales. Adicionalmente, ratones infectados con *E. histolytica* expresaron altos niveles de iNOS que aquellos no infectados (Jarillo-Luna, y col., 2002).

La participación de los linfocitos T en la resolución de la amibiasis ha sido controversial, ya que experimentos usando modelos murinos *in vivo* señalan que estas células no limitan directamente la infección; en cambio, *in vitro*, se ha encontrado que los linfocitos provenientes de humanos con abscesos hepáticos, son capaces de eliminar trofozoítos de *E. histolytica*. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos se han relacionado con la destrucción de trofozoítos de *E. histolytica*: *in vitro*

linfocitos purificados y activados con fitohemaglutinina fueron capaces de destruir trofozoítos de este parásito (Salata, y col, 1987). Similarmente, los linfocitos T CD4+, provenientes de pacientes con abscesos hepáticos amibianos fueron también capaces de eliminar los trofozoítos amibianos (Salata, y col., 1986; Vohra, y col., 2003).

Citocinas, tales como IL-2, IL-12 e IFN- γ , son producidas por linfocitos hepáticos y células esplénicas, durante el curso de la infección en gerbos con AHA. Este perfil de citocinas corresponde a una respuesta de tipo Th1 la cual favorece la activación de macrófagos y neutrófilos que llevan a cabo la destrucción de *E. histolytica*. Sin embargo, también se ha reportado la inducción de interleucinas como IL-1 e IL-10 durante la infección de *E. histolytica*, las cuales están asociadas a una respuesta tipo Th2. Esta última pudiera ser un mecanismo de defensa de *E. histolytica* para evitar una respuesta celular tipo Th1, la cual controla esta parasitosis (Talámas-Rohana, y col., 1995).

1.9. Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y algoritmos de predicción

Existen dos tipos de genes polimórficos del MHC por sus siglas en inglés (Major Histocompatibility Complex), los genes de clase I (MHC-I) y los de clase II (MHC-II), los cuales codifican dos grupos de proteínas estructuralmente diferentes pero homólogas. Las moléculas de clase I del MHC presentan péptidos a las células T CD8+ y son reconocidas por éstas, mientras que las moléculas de clase II presentan péptidos a las células T CD4+ (Abbas, y col., 2002).

Todas las moléculas del MHC comparten una serie de características estructurales, que son esenciales para su papel en la presentación de péptidos y en el reconocimiento de éstos, por los linfocitos T (Abbas, y col., 2002).

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas sin enlaces covalentes: la cadena α 44 a 47 kDa esta codificada por el MHC de y la subunidad de 12 kDa denominada β 2 microglobulina. El surco de unión de los péptidos, en las moléculas del MHC-I consiste en dos estructuras alfa hélices de 32 a 34 kDa, anclados por una estructura beta plegada (Madden, y col., 1993; Stern, y col., 1994).

La unión de los péptidos es llevada a cabo por una red de puentes de hidrógenos, entre la secuencia de los péptidos y el surco de unión y a través de interacciones entre las cadenas laterales, de la cadena de los péptidos y el interior del surco de unión (Madden, y col., 1993; Stern, y col., 1994)

Los péptidos presentados por las moléculas del MHC clase I, son entre 8 y 11 aminonoácidos (aa) de longitud. La molécula de MHC de clase I acomoda el de péptido en el interior del surco de unión (Madden, y col., 1993).

Los péptidos presentados a través de las moléculas del MHC de clase II, pueden tener una longitud hasta de 30 aa (Brusic, y col., 1998). El surco de unión de las moléculas del MHC de clase II, tiene extremos abiertos y acomoda un núcleo de 9 aa en su interior, (Stern, y col., 1994).

Los residuos polimorficos entre los péptidos y el surco de unión, determinan el repertorio de unión. La diversidad de las moléculas del HLA, incrementan la probabilidad de que un antígeno extraño, pueda contener péptidos de unión al MHC apropiados, para el desarrollo de una respuesta inmune. Los aminoácidos que conforman el surco de unión, de las moléculas del MHC, determinan la especificidad de la unión al péptido. Sólo un conjunto limitado de aminoácidos de un péptido, puede actuar como ancladores en determinadas posiciones internas, en particular para cualquier molécula del MHC dada. La posiciones de anclaje son por consiguiente, la clave fundamental para definir los modelos comunes de motivos de unión (Falk, y col., 1991).

La identificación de una variedad de motivos de unión al MHC y caracterización experimental de miles de alelos específicos y epítopes para células T, proporcionan una información sólida para la predicción computacional de péptidos de unión. Esto ha generado el desarrollo de una variedad de algoritmos para la predicción de péptidos de unión al MHC (Brusic, y col., 2004)

Existen diferentes métodos de predicción de unión de péptidos a las moléculas del MHC, los cuales se basan principalmente en las siguientes etapas: (Brusic, y col., 2004)

1. Realizar una lista de péptidos con afinidad a la molécula del MHC de unión conocida (o un sistema definido de moléculas del MHC) y la conversión de estos datos a un formato conveniente para la entrada a una computadora, generando un entrenamiento y pruebas estadísticas para el sistema de la predicción.
2. Definir los algoritmos y sus parámetros, de modo que la computadora pueda producir la salida requerida.
3. Entrenamiento del modelo, usando los datos del entrenamiento del paso 1
4. Determinar la exactitud del modelo computado, aplicando predicciones a los datos de prueba, totalmente independientes del paso 1
5. Si los resultados de la prueba no son satisfactorios, se repiten los pasos 2-5, redefiniendo el modelo hasta que sea aceptable.

Después de que se desarrolla y se prueba un sistema de predicción, está listo para su uso, para predecir epítomos potenciales de unión al MHC de proteínas. Los métodos de uso general para la predicción de unión de epítomos al MHC se muestran en la **Tabla 3** (Brusic, y col., 2004)

Tabla 3. Tipos generales de sistemas de predicción para péptidos de unión al MHC

Método de predicción	Sistema de predicción de unión al MHC
Estadísticos	Matrices cuantitativas, Modelo oculto de Markov
Estructurales	Motivos de unión
Heurísticos	Similitud de secuencia
Neurales	Redes Neuronales Artificiales
Modelado computacional	Modelado Molecular
Combinado	Modelado molecular/Modelo Oculto de Markov

1.9.1 Sistema de predicción de unión al MHC

1.9.1.1. Similitud de secuencia

Una clave lógica es la semejanza que se presenta entre la secuencia de un péptido de unión al MHC conocido, y un epítipo de interés. La semejanza de secuencia usualmente es determinada usando métodos de alineamiento estándares como BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) o FASTA (Brusic, y col., 2004).

Las matrices estándares de comparación disponibles en base a estos programas no son convenientes para predecir péptidos de unión al MHC, ya que estos métodos son los menos exactos para la predicción de péptidos de unión al MHC, por lo cual deben ser evitados, si es posible (Brusic, y col., 2004).

1.9.1.2. Motivos de unión

Los motivos de unión, describen aquellos aminoácidos con una posición particular dentro de un péptido, los cuales se pueden unir específicamente a las moléculas del MHC. Los primeros motivos alelos específicos fueron reportados a partir de moléculas de clase II de ratón I-Ad a I-Ed, los cuales permitieron la predicción potencial de epítomos de células T (Sette, y col. 1989). Reportes basados en el uso de la secuenciación y espectrometría de masas han permitido identificar múltiples y diversos motivos (Prilliman, y col, 1998). La base de datos más completa con 4500 motivos de unión al MHC tanto de clase I como de clase II, esta disponible en <http://www.syfpeithi.de/>.

Los programas de motivos de unión son fáciles de ejecutar y entender, pero su exactitud es baja (Kast, y col.1994). Las limitaciones del valor predictivo de los motivos de unión, sugieren que factores como el tamaño y los residuos de anclaje, también son determinantes en la unión al péptido (Ruppert, y col, 1994).

1.9.1.3. Matrices cuantitativas

Las matrices cuantitativas proporcionan coeficientes para cada aminoácido y para cada posición contenida en el péptido. Estos coeficientes pueden ser utilizados con una formulación apropiada para calcular los resultados que predigan la unión del péptido. Las suposiciones que sostiene este método son: a) cada posición contenida en el péptido contribuye independientemente para la unión para una molécula del MHC y b) un residuo situado en una posición dada del péptido contribuye con una cantidad igual a unir, incluso dentro de diversos péptidos. Las matrices cuantitativas de unión han sido definidas para diversas moléculas del MHC de clase I y II (Schafer, y col., 1998; Southwood, y col., 1998). Dichas matrices fueron definidas directamente a

partir de datos experimentales de unión a péptidos (Parker, y col., 1994; Schönbach, 1996), exploración posicional, librerías combinatorias, o por datos de combinación de péptidos de unión a partir de diversas fuentes y mediante uso de algoritmos de búsqueda, para coeficientes aptos para la matriz. (Brusic, y col., 1997).

El método TEPITOPE, para predicción de moléculas HLA-DR de humanos de clase II, incorpora múltiples matrices cuantitativas para la identificación de péptidos promiscuos de unión (Sturniolo, y col., 1999)

El método de matrices cuantitativas, representa una extensión del método de motivos de unión, es un método simple y eficaz para implementar. La deficiencia de éste método es que la suposición de la contribución independiente a que une, no hace caso de la contribución de la estructura total del péptido. Las matrices cuantitativas que han sido reportadas, son más exactas en la predicción, comparadas con el método de motivos de unión (Brusic, y col., 2004).

1.9.1.4. Redes Neurales Artificiales

Los métodos de inteligencia artificial usando ANNs por sus siglas en inglés (Artificial Neural Networks), están basados en modelos que pueden capturar relaciones complejas en los conjuntos de datos y no están basados sobre simplificación de suposiciones como las matrices cuantitativas (Borras-Cuesta, y col., 2000).

Las ANNs son modelos que consisten de un número de unidades interconectadas que son activadas por señales de transmisión. Las ANNs pueden tolerar un grado de datos erróneos, y clasificarlos en datos no lineales, por lo que hace de ellos métodos altamente apropiados para procesar información biológica inespecífica. Los datos de unión a los péptidos contiene ambigüedad por la longitud variable de péptidos e incertidumbre sobre la posiciones de las regiones del centro de unión (Borras-Cuesta, y col., 2000).

Las ANNs necesitan un pre-procesamiento, este pre-procesamiento involucra alineamientos de péptidos similares hacia la posición de anclaje, las posiciones de anclaje están bien definidas para los péptidos de unión hacia el MHC de clase I. Sin embargo, los péptidos de unión al MHC de clase II tiene motivos degenerados y su alineamiento tiene una mayor dificultad, por lo que requieren aplicación de técnicas de alineamiento computacional más sofisticado (Brusic, y col., 1999). La sensibilidad y especificidad de predicción por ANNs son proximas al 80% (Brusic, y col., 1998).

Las ventajas de la ANNs son que pueden adaptarse y pueden mejorar por ellas mismas, generalizan correctamente, son efectivas con problemas no lineales y son tolerantes a ciertos niveles de datos erróneos. Por ello, cuentan con un número amplio de parámetros, como una gran cantidad de datos de unión, que simplifican los métodos de predicción. Se ha reportado que las ANNs son predictores más exactos que las matrices cuantitativas (Borras-Cuesta, y col., 2000).

1.9.1.5. Modelo oculto de Markov

Los modelos ocultos de Markov HMMs por sus siglas en inglés (Hidden Markov Models) son modelos estadísticos que pueden capturar relaciones complejas en conjuntos de datos. Un HMM es un trabajo en estado finito, que determina la transición de un sistema de procesos entre estados usando probabilidad asociada a distribuciones. Estos pueden modelar un conjunto de variables de gran tamaño, desarrollando así secuencias de modelado biológico apropiadas (Mamitsuka, y col., 1998). HMMs han sido reportado como predictores de péptidos de unión al MHC con una alta exactitud (Mamitsuka, 1998).

Los HMMs realizan predicciones con una exactitud similar a las ANNs y requieren un conjunto mayor de datos para su entrenamiento, que las matrices cuantitativas. La principal ventaja es que éstos no requieren un pre-procesamiento de péptidos antes de ser entrenados.

1.10. Vacunas en desarrollo contra la amibiasis

Diversos antígenos de superficie de *E. histolytica* se han usado como posibles candidatos vacunales. Algunos de ellos son la lectina Gal/GalNAc (Mann, 2002; Petri, y col., 2002); la proteína de superficie rica en serina “SREHP” (Zhang & Stanley, 1994); la lipofosfoglicana “LPG” (Marinets, y col., 1997); la adhesina EhADH-112 (Martinez-Lopez, y col., 2004; Madriz-Garcia, y col., 2004).

La lectina Gal/GalNAc realiza una función importante en la patogénesis de la amibiasis, mediante su adherencia a las mucinas del colon, su citotoxicidad y resistencia al complemento (Ravdin, 1989; Frederick & Petri, 2005). Se ha demostrado que anticuerpos contra epítomos de la lectina Gal/GalNAc inhiben la adherencia de la amiba a las células blanco (células CHO). Por otro lado, existen epítomos de la subunidad de 170 kDa de la lectina ricos en cisteína, implicados

en la regulación de una respuesta inmune celular frente a la amibiasis (Petri, y col., 1990; Seguin, y col., 1995).

La lectina Gal/GalNAc de forma nativa, ha sido usada en la vacunación de gerbos para protegerlos contra el absceso hepático amibiano. La inmunización protegió al 67% de los animales, aun cuando el resto de los animales tuvo un incremento significativo del tamaño del absceso hepático, sugiriendo que la respuesta inmune para la lectina, también puede exacerbar la enfermedad (Petri & Ravdin, 1991).

Por otro lado, estudios realizados por Ivory y col., en 2006, inmunizando gerbos con la lectina Gal/GalNAc de forma nativa, más oligodesoxinucleotidos de citosina y guanina (CpG-ODN) como adyuvante para incrementar la respuesta inmune celular Th1, encontraron que los gerbos desarrollaban una notable respuesta de linfoproliferación frente a la lectina Gal/GalNAc y un título alto de anticuerpos específicos contra Gal/GalNAc, capaces de bloquear la adherencia de la amiba a las células CHO. Así mismo, se encontraron altos niveles de IFN γ e IL-12, lo que se asocia con una protección del 100% contra el AHA (Ivory, y col., 2006).

La proteína de superficie rica en serina (SRHEP), está localizada en la superficie de la amiba, su región central contiene unidades repetidas en “tandem” de serina. La función exacta de SRHEP permanece desconocida, aun cuando se ha observado que está podría mediar la unión de trofozoítos de *E. histolytica* a células eucariontes (Zhang, y col., 1994; Stanley, 1995).

La proteína recombinante SREHP, fusionada a la proteína de unión a manosa (MBP), ha sido una vacuna efectiva para prevenir el AHA en un modelo de infección de gerbos. En un total de tres ensayos, el 64% de los gerbos vacunados intraperitonealmente con la SREHP/MBP recombinante, fueron completamente protegidos ante el desarrollo de AHA, después de la inoculación hepática directa, de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (Zhang, y col., 1994).

Estudios realizados con la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales específicos contra LPG en ratones SCID mostraron que hubo una protección efectiva del 91.7% ante el desarrollo del AHA. Sin embargo, la producción de LPG amibiano tendría como limitante la falta de las cadenas complejas de glicana, unidos a residuos de fosfoserina en el esqueleto del polipéptido (Marinets y col, 1997).

EhCPADH es un complejo inmunogénico, formado por las proteínas Cistein-proteasa (EhCP112) y la Adhesina (EhADH112) polipéptidos involucrados en la adhesión, efecto citopático y fagocitosis de *E. histolytica* (Arroyo & Orozco, 1987; Garcia-Rivera, y col., 1999).

Se ha demostrado que la inmunización de hámsteres con polipéptidos recombinantes de la EhADH112 inoculados por vía subcutánea, inducen una respuesta inmune humoral contra el complejo EhCPADH, así como una protección parcial del 75% contra el AHA. Sin embargo no se observó una correlación entre el título de anticuerpos y la protección contra el AHA (Martínez-López y col., 2004).

Madriz-Garcia y col. 2004, evaluó la respuesta inmune en animales inoculados con los plásmidos pcDNA-Ehcp112, que contiene la secuencia del gen de la cistein-proteasa y pcDNA-Ehadh112, que codifica para la región del carboxilo terminal del gen de la adhesina, y además inoculó una mezcla de ambos plásmidos. La co-inmunización de los animales con los dos plásmidos originó la inducción de una respuesta de anticuerpos IgG anti-*E. histolytica* de forma más temprana y superior respecto a la inmunización con los plásmidos separados (Madriz-Garcia y col., 2004)

La inmunización con los plásmidos indujo una respuesta celular, siendo ésta mayor cuando se inmunizó con el plásmido pcDNA-Ehadh112, en comparación a la inmunización con el plásmido pcDNA-Ehcp112 (Madriz-Garcia y col., 2004). En contraste, la respuesta inmune celular no fue

notablemente superior en la mezcla de los plásmidos. De forma interesante, la disminución contra el AHA fue solamente detectada en animales que recibieron la mezcla de los plásmidos más no así cuando se inocularon los plásmidos de forma independiente (Madriz-Garcia y col., 2004).

La identificación de los epítopes T del tipo Th1 en las proteínas EhADH112 y EhCP112 en el presente trabajo, abrirá la posibilidad de considerarlos como posibles antígenos específicos para el desarrollo de vacunas de subunidades para inducir una inmunidad celular protectora contra la amibiasis invasora, por lo que en el futuro deberá de evaluarse la formulación, vía de administración, dosis y protección.

2. Justificación

Entamoeba histolytica causa aproximadamente 100, 000 muertes por año ocupando el tercer lugar de mortalidad debida a protozoarios parásitos a nivel mundial. A pesar de las medidas higiénicas preventivas adoptadas en diversos países, la amibiasis continúa siendo un problema de salud pública en países en desarrollo como el nuestro.

Durante la parásitosis se genera una respuesta inmune humoral y celular, lo que ayuda a limitar la infección en individuos inmunocompetentes. Esta respuesta inmune orquestada durante la infección por *E. histolytica*, ha sido estudiado por más de una década con la idea de producir vacunas que protejan efectivamente a la población expuesta en áreas endémicas.

Se ha reportado que *E. histolytica* puede dirigir la respuesta inmune hacia un perfil Th2, lo cual no parece afectar al parásito, sino que favorece su invasión y sobrevivencia. (Talámas-Rohana, y col., 1995).

Por otro lado, estudios realizados en gerbos inmunizados con la lectina Gal/GalNac de forma nativa, más oligodesoxinucléotidos de citosina y guanina (CpG-ODN) como adyuvante para incrementar la respuesta inmune celular Th1, mostraron que los gerbos inmunizados desarrollaban una respuesta notable de linfoproliferación frente a la lectina Gal/GalNac y un título alto de anticuerpos específicos contra Gal/GalNac, los cuales eran capaces de bloquear la adherencia de la amiba a las células CHO. Así mismo, se encontraron altos niveles de IFN- γ e IL-12, citocinas de tipo Th1, lo que se asoció con una protección efectiva del 100% contra el AHA (Ivory y col., 2006)

Por lo tanto la identificación de los epítopes T del tipo Th1 en las proteínas EhADH112 y EhCP112, abrirá la posibilidad de considerarlos como posibles antígenos para la inducción de la inmunidad protectora contra, la amibiasis invasora.

3. Hipótesis

Las proteínas EhCP112 y EhADH112 de *Entamoeba histolytica* tienen epítomos del tipo Th1, por lo que podrían ser identificados mediante el patrón de expresión de citocinas Th1 inducidas en los esplenocitos de hámsteres.

4. Objetivo General

Identificar epítomos T del tipo Th1 en las proteínas del complejo EhCPADH de *Entamoeba histolytica*.

5. Objetivos Particulares

1. Realizar un análisis *in silico* para predecir epítopos T de las proteínas EhADH112 y EhCP112.
2. Clonar, expresar y purificar los epítopos T predichos *in silico*.
3. Estudiar la respuesta inmune humoral y celular inducida por la inmunización de los poliepítopos .
4. Identificar los epítopos Th1, por medio del perfil de citocinas expresadas en esplenocitos de hámsteres inmunizados con los epítopos sintéticos predichos *in silico*

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas Bacterianas

Escherichia coli DH5 α (*E. coli*): F⁻ end A1, *gyrA*96, Thi⁻ 1, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1, F 80D *lacZD* M15, D (*lac ZYA-argF*) U169.

E. coli BL21(DE3) pLys E: B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*, *gal*1(DE3), (pLYSE Cam^r). Contienen un inhibidor de la RNA polimerasa T7 para prevenir la expresión en células no inducidas y el plásmido pLysE con T7 lisozima.

6.2. Plásmido

El pGEX-6P-1, posee un tamaño de 4984 pb y se utilizó para la clonación de los genes de los poliepítopos T de las proteínas del complejo EhCPADH. Codifica para una proteína Glutación-S-transfera (GST) como proteína de fusión, posee una región de multiclonación un marcador de resistencia a ampicilina, el gen *lac I* y el promotor *tac*. **Figura 2**

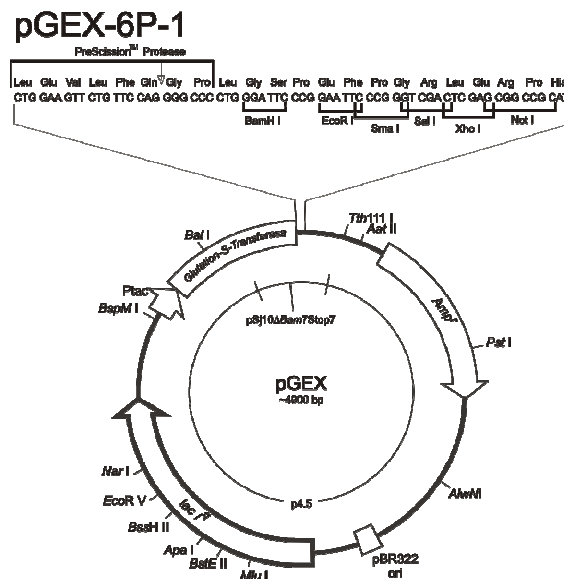


Figura 2. Representación esquemática del vector pGEX-6P-1. *Amp^r*, gen de resistencia para el antibiótico ampicilina; *ori*, origen de replicación; *lacI^q*, gen de la proteína represora del promotor *tac*, el cual previene la expresión de la GST hasta la inducción por IPTG; sitio de multiclonación.

6.3. Antibióticos

Ampicilina: se disolvió en agua destilada estéril a una concentración de 100 mg/ml. En los medios de cultivo se ajustó a una concentración de 100 µg/ml, se usó para la selección de transformantes portadoras del plásmido pGEX-6P-1.

Cloranfenicol: se disolvió en etanol absoluto grado biología molecular a una concentración de 34 mg/ml. En los medios de cultivo se ajustó a una concentración de 34 µg/ml, se usó para la selección de bacterias (CamR)

6.4. IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido)

Se utilizó IPTG como inductor del promotor *tac*, se preparó a una concentración de 100 mM. En los medios de cultivo se ajustó a una concentración final de 1 mM.

6.5. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB)

Para la propagación y mantenimiento de *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) pLys E, se utilizó el medio Luria-Bertani, el cual contenía la siguiente composición.

Triptona	10 g
Extracto de lavadura	5g
Cloruro de sodio	10 g
Agua c.b.p	1000 ml

Cuando se requirió preparar medio sólido, se le adicionaron 15 g de agar a la mezcla anterior.

6.6. Tritón X-100

Tritón X-100 se disolvió en PBS a una concentración del 20%. (20g en 100 ml de PBS). Se usó en la prueba de solubilidad de la proteína recombinante a una concentración de 1%.

6.8. Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine)

Sarcosyl se disolvió en PBS a una concentración del 20%. (20g en 100 ml de PBS). Se usó en la solubilización de los cuerpos de inclusión de las proteínas recombinantes a concentraciones de 0.6%, 1% y 1.5%.

6.9. EDTA

EDTA se disolvió en agua destilada a una concentración de 0.5M (186.1g en 1000 ml de agua destilada). Y se ajustó a un pH de 8.0 con hidróxido de sodio

6.10. SDS

SDS (Duodecil Sulfato de Sodio) se disolvió en agua destilada a una concentración del 10% (1 g en 100 ml)

6.11. Regulador TAE (Tris-Acetato EDTA)

Para el corrimiento electroforético de ácidos nucleicos en geles de agarosa se utilizó el regulador TAE 1X, a partir de una solución de trabajo al 50X el cual contenía la siguiente composición

Tris ultrapuro	242 g
Ácido acético glacial puro	57,1 ml
E.D.T.A. 0.5M, pH 8	100 ml
Agua c.b.p	1000 ml

Hidróxido de sodio puro para ajustar a pH 8 y esterilizado por autoclave 15 lb a 121°C por 15 min.

6.12. Regulador Tris-Glicina SDS

Para el corrimiento electroforético de proteínas en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida se utilizó el regulador Tris-Glicina SDS al 1X, con solución de trabajo al 10X, el cual contenía la siguiente composición.

Tris base	30.3 g
Glicina	144.0 g
SDS	100 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

6.13. PBS (Solución Reguladora de Fosfatos)

Para la re-suspensión de las bacterias para sonicar se utilizó el regulador PBS 1X, con solución de trabajo al 10X, el cual contenía la siguiente composición.

NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
Ajustado a un pH de 7.3	

6.14. Marcadores de tamaño molecular

Los marcadores de tamaño molecular usados en los ensayos electroforéticos fueron 2 log ladder (NEB) y 100 bp ladder (NEB)

6.15. Marcadores de peso molecular

El marcador de peso molecular usado en los ensayos de SDS-PAGE y la inmunodetección fue PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)

6.16. Enzimas

Las enzimas fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones del fabricante y se enlistan a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Enzimas

Enzima	Concentración	Marca	Temperatura
<i>EcoR</i> I	10 U/μl	NEB	37 °C
<i>Xho</i> I	10 U/μl	NEB	37 °C
Taq DNA pol	5 U/μl	Invitrogen	61-94 °C
T4 DNA ligasa	3 U/μl	NEB	16 °C

6.17. Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de DNA plasmídico y de productos de PCR de los genes sintéticos sin restringir y restringidos con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I a 37°C durante 3 h se analizaron en geles de agarosa al 1.5% usando el regulador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8.0) a 95-100 volts. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y se visualizaron con luz UV, en un documentador de geles (Gel Doc, BioRad).

6.18. Predicción de epítomos T mediante Análisis *in silico*

El análisis *in silico* de epítomos T se realizó con el programa PROPPRED, usando el servidor <http://www.imtech.res.in/raghava/propred>. Los epítomos predichos con el programa PROPPRED de las proteínas EhADH112 y EhCP112, se consideraron como epítomos promiscuos cuando se unieron a más del 50% de los HLA-DR incluidos en su base de datos del programa, utilizando un umbral ajustado al 3%.

6.19. Diseño y Síntesis de oligos

A partir de la secuencia de DNA de *E. histolytica* que codifica para las proteínas EhCP112 y EhADH112 (No. de acceso NCBI AF127375) se hizo la traducción con el programa “Gene runner versión 3.05”, y se identificaron las secuencias de codones que codifican los aminoácidos correspondientes a los epítomos T promiscuos predichos *in silico*. Una vez identificadas las secuencias de codones de *E. histolytica* para los epítomos T, se optimizaron para el uso

preferencial de codones en *E. coli* mediante el programa DyNAVacS ubicado en la siguiente URL <http://miracle.igib.res.in/dynavac>.

Posteriormente, a la secuencia de DNA con los epítomos T se le adicionaron secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoR* I en el 5' y *Xho* I en el 3' y 6 nucleótidos más en cada extremo para facilitar el corte de las enzimas.

6.20. Ensamble de los genes sintéticos para los poliepítomos de la EhADH112 y EhCP112

El diseño del ensamble de los genes sintéticos para los poliepítomos se determinó utilizando el programa PCR-Oligomaker, localizado en la URL:

<http://publish.yorku.ca/~pjohnson/AssemblyPCROligomaker.html>. El programa diseñó una serie de oligonucleótidos que tenían regiones complementarias las cuales sirvieron como iniciadores para la extensión de la DNA polimerasa, la cual rellenó las regiones existentes entre dichos oligodesoxinucleótidos. Los oligonucleótidos para el ensamble se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Oligonucleótidos para el ensamble de los genes sintéticos para los polieptópos

EhADH112 y EhCP112

Nombre	Secuencia
ensamADH1	5'-CCCCGGGAATTCTGCAGACCCTGACCACCCTGGCGCTGGGCTGCGC-3
ensamADH2	5'-GAATGCCCTGCGCCACCGCGTTAATATGCATAATCAGATGCGCGCAGCCCAGCG-3
ensamADH3	5'-GTGGCGCAGGGCATTCCGCAGGATATTATTATTAACGCGAACCAGCTGAAACAGCTG-3
ensamADH4	5'-TGGTAATAAATTCCATCTGCTGGCAAATGCTGTTATAGGTGTTTCAGCTGTTTCAGGCGGT-3
ensamADH5	5'-GCCAGCAGATGGAATTTATTACCACCATTGAAGCGATTAATAATTTATGAAAAAACGAAAAATTACCGG-3
ensamADH6	5'-GTTAATCGCCACGCGCAGGCGCTGCACCATGCCGGTAATTTTTTCGTTTTTTTCATAAATTTTAAT-3
ensamADH7	5'-TGCGCGTGGCGATTAAACGCGGCGGATCTGAGCATGGTGGCGCAGCATTACCGGCAACA-3
ensamADH8	5'-TAATACGACTCACTATAACCCCGCTCGAGTTACTGGCTGTTGCCGGTAATGCTGC-3
ensamCP1	5'-CCCCGGGAATTCTATATTCGCATTAAAACCACCAACCTGTGCGGCATTATGGTGCT-3
ensamCP2	5'-CGCTCACCAGAAACGGGGCCATAATGATGCAGCAGTTTTTTTCAGCAGCAGCACCATAATGCCGCAC-3
ensamCP3	5'-CCCGTTTCTGGTGAGCGTGAAAGTGAGCGGCACCGGCTTTAGCGTGGTGCTGATGGATGGCTATCG-3
ensamCP4	5'-CGCTCGCCAGCTGTTGCGAATAATAAAATATTCCACGCATTCCGATAGCCATCCATCAGCACC-3
ensamCP5	5'-ACAGCTGGGCGAGCGGCTGGATTGTGGTGGCGTTTCTGCTGCTGGTGAGCAACCAGAAAACCCA-3
ensamCP6	5'-TAATACGACTCACTATAACCCCGCTCGAGTTAAATGCTCTGGGTTTCTGGTTGCTCAC-3

La Tm de ensamble fue de 60°C

A la vez, el programa diseñó un par de iniciadores para amplificar aquellas cadenas de oligonucleótidos que presentaron la secuencia y longitud esperada para la cadena de DNA codificante. Los oligonucleótidos para la PCR de amplificación se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación del gen sintético de los poliepítopos

EhADH112 y EhCP112

Nombre	Secuencia
flanqADH1	5'-CCCCGGGAATTCCTGCA-3'
flanqADH2	5'-TAATACGACTCACTATACCCCCG-3'
flanqCP1	5'-CCCCGGGAATTCTATATTCGC3'
flanqCP2	5'-TAATACGACTCACTATACCCCCG-3'

La T_m de amplificación fue de 60°C

Para la PCR de ensamble se usaron 4 µl de cada oligonucleótido (0.125 µg/µl), 4 µl de dNTPs (5mM), 10 µl de Buffer de PCR 10X, 0.5 µl de Taq polimerasa, se ajustó a un volumen final de 100 µl con agua destilada estéril. La mezcla se sometió a 8 ciclos de amplificación a 94 °C (1.5 min), 60 °C (2 min) y 72 °C (3 min). Previo a los ciclos se aplicó un ciclo de desnaturalización de 94 °C durante 7 min, después del último ciclo se adicionó una etapa de extensión de 72 °C por 5 min. Como control negativo se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente, pero se omitió la Taq polimera.

Para la PCR de amplificación se usó 1 µl de la mezcla de la primera reacción de PCR, 4 µl de cada primer (0.250 µg/µl), 4 µl de dNTPs (5mM), 10 µl de Buffer de PCR 10X, 1.5 U de Taq polimerasa y se ajustó a un volumen final de 100 µl con agua destilada estéril. La mezcla estuvo sujeta a 25 ciclos de amplificación a 94 °C (1.5 min), 54 °C (2 min) y 72 °C (3 min). Previo a los ciclos se aplicaron 94°C durante 7 min. Después del último ciclo se adicionó una etapa de 72 °C por 5 min. Como control negativo se utilizó las condiciones mencionadas anteriormente pero se sustituyó el producto generado en el PCR de ensamble por agua destilada estéril.

6.21. Clonación de los genes sintéticos de los poliepítopos T del complejo EhCPADH

6.21.1. Purificación del plásmido pGEX-6P-1

La purificación del plásmido pGEX-6P-1 se realizó con la técnica de miniprep de acuerdo a las especificaciones del “kit” FastPlasmid™ Mini (Eppendorf).

6.21.2. Digestión de los genes sintéticos de los poliepítopos T con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xho* I.

La digestión por cada microgramo de los genes sintéticos de los poliepítopos de T obtenidos por PCR se realizó con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I según las especificaciones del fabricante (New England Biolabs, USA), se utilizó el “buffer *EcoR* I”, temperatura de 37°C y una incubación de 3 h. Así mismo la digestión por cada microgramo de vector p-GEX-6P1 se realizó con las enzimas y condiciones mencionadas, y se purificó a partir de gel de agarosa con el “kit” (QUIAEX II, QIAGEN).

La concentración de DNA restringido se determinó en gel de agarosa al 1.5% usando 1 µg/carril de marcador 2 log (New England Biolabs).

6.21.3. Ligación de los genes sintéticos de los poliepítopos EhCP112 y EhADH112 en el vector pGEX-6P-1

Los productos digeridos de los genes sintéticos de los poliepítopos T se ligaron al vector pGEX-6P-1 usando una relación molar 5:1, inserto:vector se mezclaron 1.5 µl (5U) de ligasa T4, 3 µl de

buffer de ligación 5X, 5 µl de inserto (250 moles) y 1.5 µl de pGEX-6P-1 restringido con *EcoR* I y *Xho* I (50 moles) y 4 µl de agua estéril. La mezcla se incubó 16 h a 16°C, como control negativo se hizo una mezcla similar omitiendo el inserto.

6.22.Transformación

6.22.1. Preparación de bacterias *E. coli* cepa BL21 (DE3) competentes

A 5 mL de medio LB se adicionó una colonia bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3), se incubó toda la noche en agitación constante a 250 rpm a 37 °C. De este cultivo se tomaron 2.5 ml y se agregaron a 250 ml de medio LB, se incubaron 2 h con agitación constante a 37°C hasta obtener una D.O._{595nm} = 0.5, el cultivo se centrifugó a 1000 X g durante 1 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 ml de MgCl₂ 0.1 M frío, nuevamente las bacterias se centrifugaron a 1000 X g durante 1 min. El sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron en 100 ml de CaCl₂ 0.1 M frío, se colocaron en hielo 20 min, se volvió a centrifugar a 10000 X g durante 1 min. y se descartó el sobrenadante. Finalmente la pastilla, se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0.1 M y 1.75 ml de glicerol estéril, se hicieron alícuotas de 50 µl en tubos de Eppendorf y se almacenaron a -70 °C.

6.22.2.Transformación de *E. coli*

Para la introducción de los plásmidos recombinantes a *E. coli*, se usaron 2 µl de la mezcla de ligación descrita anteriormente y se mezcló con 100 µl de bacterias competentes de *E. coli*. BL21

(DE3), se incubaron en hielo por 30 min Posteriormente se aplicó un choque térmico de 42°C por 90 S y después se incubaron en hielo 5 min.

Al término de este tiempo se adicionaron 600 µl de medio LB y se incubó en agitación 1 h a 37°C. Finalmente las bacterias se sembraron por espatulado 200 µl de cultivo en cajas LB sólido con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/ml), y se incubaron invertidas a 37° por 24 h.

6.22.3. Análisis de restricción del DNA plasmídico recombinante

El análisis de restricción del DNA plasmídico de las transformantes se llevó a cabo con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I, para corroborar la presencia del fragmento de interés. Las clonas que liberaron el inserto de 391 y 249 pb correspondientes al DNA de los poliepitopos EhADH112 y EhCP112 respectivamente, se resembraron para obtener los abastos de DNA plasmídico.

6.22.4. Secuenciación de los plásmidos recombinantes

Para verificar la integridad y el marco de lectura de los genes clonados respecto al vector, se determinó la secuencia nucleotídica utilizando oligonucleótidos específicos para el vector pGEX-6P-1 mostrados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Secuencia de iniciadores para secuenciar el plásmido pGEX-6P-1

Nombre	Secuencia	Posición de Alineamiento
Iniciador de secuenciación PGEX 5'.	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	869-891
Iniciador de secuenciación PGEX 3'.	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCTCAGAGG-3'	1056-1034

6.23. Inducción y purificación de los poliepítopos recombinantes

6.23.1. Inducción de la expresión de los péptidos recombinantes

Una colonia de bacterias transformadas se creció en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) por (3h), se tomó 1 ml del cultivo y se adicionaron a 250 ml de medio LB-ampicilina-cloranfenicol y se continuó el crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una $D.O_{600nm}=0.6$, En este punto se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM, y se incubó durante 3 h a 37°C.

6.23.1. Extracción de los poliepítopos recombinantes

Alícuotas de 1.5 ml tomadas de los cultivos bacterianos se centrifugaron a 12000 g en una microcentrífuga durante 1 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 200 µl de solución de muestra 1X (Tris HCl 125 mM, SDS 2% y glicerol 20% pH 6.8), se mezcló con vórtex durante 1 min y se hirvieron durante 5 min. Cada 60 min se tomaron alícuotas para analizar la expresión de las proteínas recombinantes por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%.

6.23.2. Inmunodetección

Los extractos bacterianos separados por SDS-PAGE, fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando el regulador de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM, metanol 20%). Luego de la transferencia se lavó la membrana 5 min con PBS (NaCl 14.0 mM , KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 1.8 mM) para posteriormente bloquearla con PBS-leche 3% (PBS-leche en polvo descremada al 3%) por un tiempo de una hora a temperatura ambiente.

Subsecuentemente se incubó con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína GST (1:12000), durante un tiempo de 1 h a temperatura ambiente. Una vez retirado el anticuerpo monoclonal se lavó la membrana tres veces con PBS durante 10 min.

La unión del anticuerpo monoclonal anti-GST se detectó usando anti-IgG de ratón hecho en cabra (1:10000) acoplado a peroxidasa. Para ello se incubaron las membranas con dicho anticuerpo durante 1 h y posteriormente se lavó de la forma descrita anteriormente.

6.23.3. Prueba de solubilidad de los poliepítopos recocombinantes

El cultivo de *E. coli* BL21(DE3) inducido con IPTG 1mM se centrifugó a 2000 rpm por 30 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 50 µl de PBS frío por cada mililitro de cultivo. Posteriormente, se sonicó con los siguientes ciclos: 3 ciclos de 30 S a una amplitud de 70. Posteriormente se tomó una alícuota de 3 ml y se adicionó Triton X-100 a una concentración final de 1%, se mezcló durante 30 min, subsecuentemente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante y los *detritus* celulares fueron analizados en SDS-PAGE 12% para identificar en que fracción se encontraban las proteínas de interés

6.23.4. Purificación de los poliepítopos T recombinantes EhADH112 y EhCP112

La purificación de los epítopos T recombinantes se realizó mediante afinidad a una matriz de glutatión sepharosa. La fracción soluble de los extractos de *E. coli* se aplicó a la glutatión sepharosa equilibrada con PBS 1X y Triton X-100 al 1%. De esta forma las proteínas recombinantes quedaron retenidas en la glutatión sepharosa hasta su elución con un gradiente de glutatión reducido de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Tris-HCl 50 mM, Glutatión reducido 10 mM, pH 8.0), recogiendo las fracciones de lavado y elución, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 12%, en geles teñidos con azul de coomassie.

6.24. Inmunización de los hámsteres con los poliepítopos T recombinantes de las proteínas EhADH112 y EhCP112

Se utilizaron hámsteres sirios dorados (*Misocricetus aureatus*) machos, con 4 semanas de edad.

Se dividieron en grupos de 5 animales, se inmunizaron por vía subcutánea en el lomo con 120 µg del péptido recombinante junto con el adyuvante incompleto de Freund. Como controles se utilizaron animales inmunizados con 120 µg de la GST y el adyuvante incompleto de Freund.

Los hámsteres fueron inmunizados tres veces en intervalos de 14 días y sangrados del plexo retro-orbital al día 0 (suero preinmune) y en cada inmunización subsiguiente.

6.25. Evaluación de la respuesta inmune desarrollada por la inmunización de epítomos T recombinantes

6.25.1 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 1 µg de los poliepítomos T recombinantes en regulador de carbonatos 0.05 M, pH 9.6) toda la noche a 4°C. Posteriormente se adicionaron 50 µl de suero de hámster (1:100) a cada pozo. Después se lavaron las placas tres veces con H₂O-Tween-20 al 0.005% y se incubaron una hora a 37°C con 50 µL de anti-IgG de hámster (1:1000) marcados con HRP, la reacción se desarrolló con OPD (Ortofenilendiamino) y H₂O₂ al 0.04% como sustrato de la peroxidasa. Se midió en un lector de ELISA a una DO de 492 nm.

6.25.2. Evaluación de la respuesta inmune celular desarrollada por la inmunización de epítomos T recombinantes

6.25.2.1. Ensayos de proliferación celular

Los hámsteres inmunizados se sacrificaron a los 64 días y se obtuvieron los esplenocitos, se adicionaron 5 ml de medio RPMI libre de suero. Posteriormente los esplenocitos se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI con 10% de FCS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

Para la proliferación celular de los linfocitos T, se cultivaron a una concentración de 2×10^5 linfocitos por pozo con 10 µg de epítomos T sintéticos. Como control negativo se utilizaron linfocitos cultivados medio RPMI, y para el control positivo los linfocitos se incubaron con 2.5 µg/ml de concanavalina A en cada pozo. Los linfocitos se cultivaron por 72 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, posteriormente se adicionó 15 µL de la solución DYE

(CellTiter 96®) y se incubó durante 4 h. La coloración adquirida se midió con un lector de placas de 96 pozos a una longitud de onda de 490 nm.

6.25.2.2. Cuantificación del patrón de citocinas por PCR en tiempo real

Los esplenocitos, se cultivaron a una concentración de 4×10^6 por pozo con 10 µg de epítomos T sintéticos. Como control negativo se utilizaron linfocitos cultivados en medio RPMI.

Una vez cultivados los esplenocitos estimulados con epítomos T sintéticos, se procedió a realizar la extracción de ARN con TRIZOL®, posteriormente las muestras con ARN se trataron con DNAsa I libre de RNasa para eliminar cualquier posibilidad de contaminación de ADN genómico.

La transcripción reversa-PCR (RT-PCR) se realizó a partir de 1 µg de ARN por muestra. se utilizó 0.5 µg de oligo dT, 10 µl de H₂O-DEPC, se incubó 10 min a 70°C. Inmediatamente después la muestra se incubó en hielo durante 5 min. Subsecuentemente a la mezcla se le adicionaron 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM y se incubó a 42°C durante 2 min. Posteriormente se le adicionó 1 µl de Superscript II 200 U/µl y se incubó a 42°C durante 50 min, una vez concluida ésta incubación se centrifugó a 10000 g a 4°C. Se inactivo la enzima incubando la mezcla a 70°C durante 15 min, después se le adicionó RNAsa libre de DNAsa y se incubó durante 20 min a 37°C. Finalmente se guardó a -70°C hasta realizar los ensayos de PCR en tiempo real.

El análisis de PCR en tiempo real se realizó por duplicado en el equipo Applied Biosystems 7300, usando: 1 µl de cADN, 0.4 µM del primer sentido, 0.4 µM del primer antisentido y

“QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN)” según las especificaciones del fabricante

Los iniciadores para el PCR en tiempo real fueron los siguientes:

IFN- γ

Sentido 5'-GGCCATCCAGAGGAGCATAG-3'

Antisentido 5'-CCATGCTGCTGTTGAAGAAGTTAG-3'

Il-4

Sentido 5'-CCACGGAGAAAGACCTCATCTG-3',

Antisentido 5'-GGGTCACCTCATGTTGGAAATAA-3'

hptr

Sentido 5'-AGATCCACTCCCATAACTGTAGATTTTAT3-3'

Antisentido 5'-CATCCGCACCATTAATTTTAAAGTC-3'

La activación de la enzima se realizó a 95°C durante 15 min. Las condiciones de amplificación consistieron en 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 56°C y 35 s a 72°C. Los niveles del mensajero para cada gen se normalizaron con relación al gen constitutivo hptr.

6.26. Bancos de datos, programas y servidores informáticos

6.26.1. Genbank

Base de datos de secuencias genómicas de la cual se obtuvieron las secuencias reportadas de los genes EhADH112 y EhADH112 de *E. histolytica* (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>).

6.26.2. PCR-Oligomaker

Programa computacional creado para la designación automatizada de oligodesoxinucléotidos para la construcción basada en PCR de moléculas de DNA de gran longitud (URL <http://publish.yorku.ca/~pjohnson/AssemblyPCRoligomaker.html>).

6.26.3.ProPred

El objetivo de este servidor fue predecir regiones de unión al MHC-II en una secuencia de antígeno, usando matrices cuantitativos derivados de la literatura publicada por Sturniolo, y col., 1999. El servidor ayudó a localizar regiones de unión promiscuas que son útiles en la selección de epítomos candidatos vacunales (URL: <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>).

6.26.4.Blast-P

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema comúnmente llamada "query" contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia query (URL: <http://www.expasy.org/tools/blast/>)

6.26.5. Clustal W

Su propósito general es el alineamiento múltiple de secuencias de DNA o proteínas. Se utilizó para evaluar si la construcción del poliepítopo no contenía relación con proteínas del hospedero. URL: <http://www.expasy.org/cgi-bin/hub>

7. Resultados

7.1 Análisis de sitios de unión a las moléculas HLA-DR presentes en las proteínas

EhADH112 y EhCP112 usando el programa ProPred

Para saber el reconocimiento que tendrían los alelos incluidos en la base de datos del programa ProPred sobre las proteínas completas, se ejecutó un análisis con umbrales de 3% (**Figura 3**) y 1% (**Figura 4**). Lo cual permitió identificar los epítomos que contienen la mejor puntuación y realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos usando una baja astringencia (umbral del 3%) y los inferidos a una mayor astringencia (umbral del 1%) con lo que se disminuyó los epítomos falsos positivos en el análisis final

El análisis *in silico* de la proteína EhADH112 reveló que el 100% (51/51) de los alelos HLA-DR reconocieron a dicha proteína cuando se usó un umbral ajustado al 3%, mientras que el 98.03% (50/51) de los mismos la reconocieron cuando se uso un umbral ajustado al 1% (**Tabla 8**).

Por otro lado, la proteína EhCP112 presentó epítomos que fueron reconocidos por el 100% (51/51) de los alelos HLA-DR (**Tabla 8**), cuando se usaron umbrales del 3% (**Figura 5**) y del 1% (**Figura 6**) aunque para este último valor de umbral se observó una disminución en el número de epítomos falsos positivos.



Figura 3. Análisis *in silico* de epítomos T con un umbral del 3% realizado con el programa ProPred para la proteína EhADH112

La línea continua representa la secuencia de aminoácidos de la proteína. Cada fila representa el análisis realizado para cada uno de los 51 alelos HLA-DR disponibles en la base de datos del programa ProPred. Las líneas discontinuas representan los epítomos identificados.

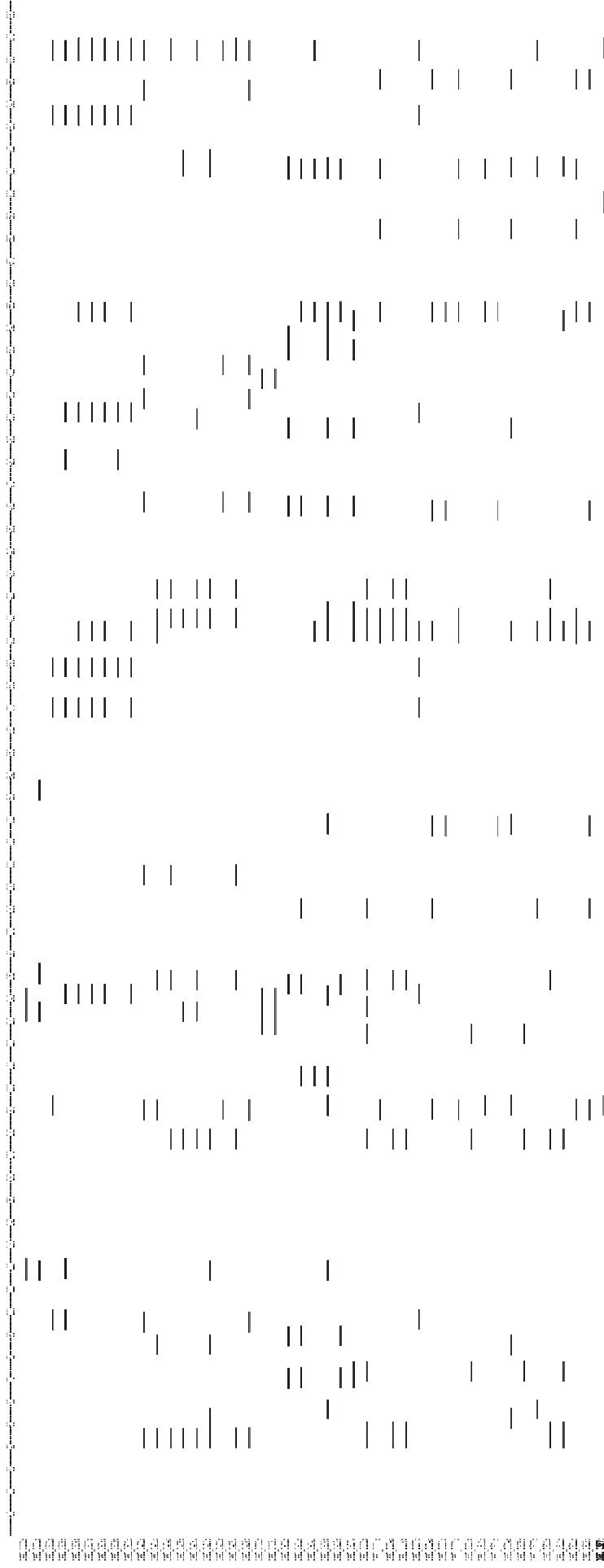


Figura 4. Análisis *in silico* de epítomos T con un umbral del 1% realizado con el programa ProPred para la proteína EhADH112

La línea continua representa la secuencia de aminoácidos de la proteína. Cada fila representa el análisis realizado para cada uno de los 51 alelos HLA-DR disponibles en la base de datos del programa ProPred. Las líneas discontinuas representan los epítomos identificados.

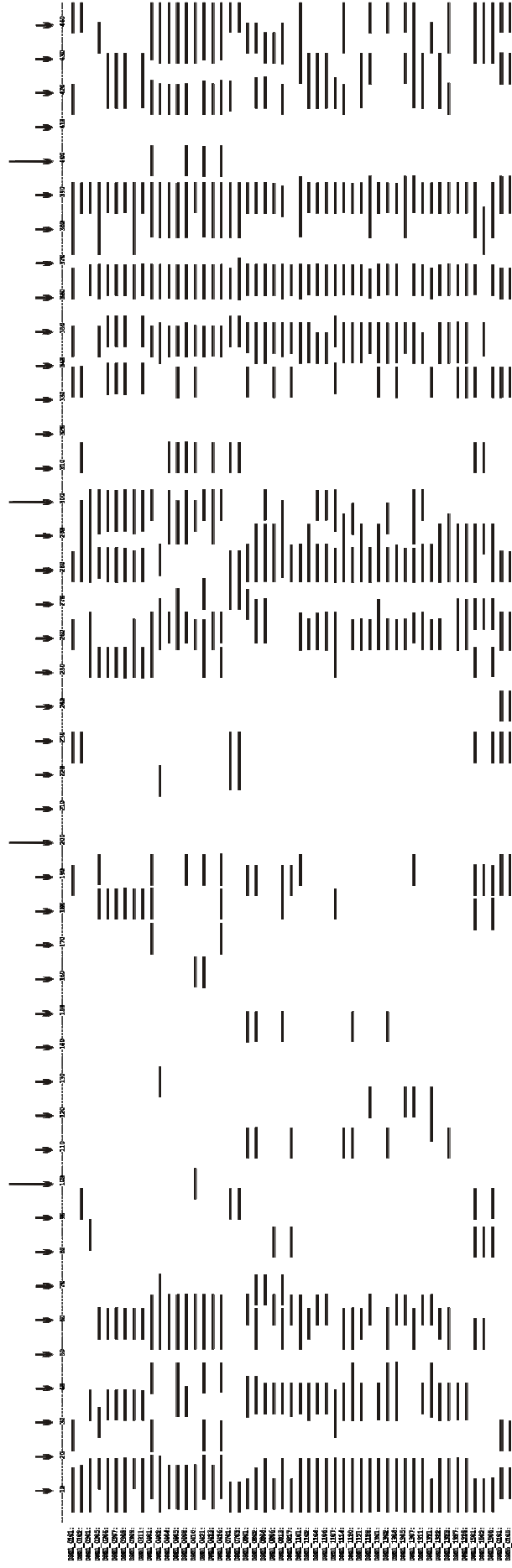


Figura 5. Análisis *in silico* de epítomos T con un umbral del 3% realizado con el programa ProPred para la proteína EhCP112

La línea continua representa la secuencia de aminoácidos de la proteína. Cada fila representa el análisis realizado para cada uno de los 51 alelos HLA-DR disponibles en la base de datos del programa ProPred. Las líneas discontinuas representan los epítomos identificados.

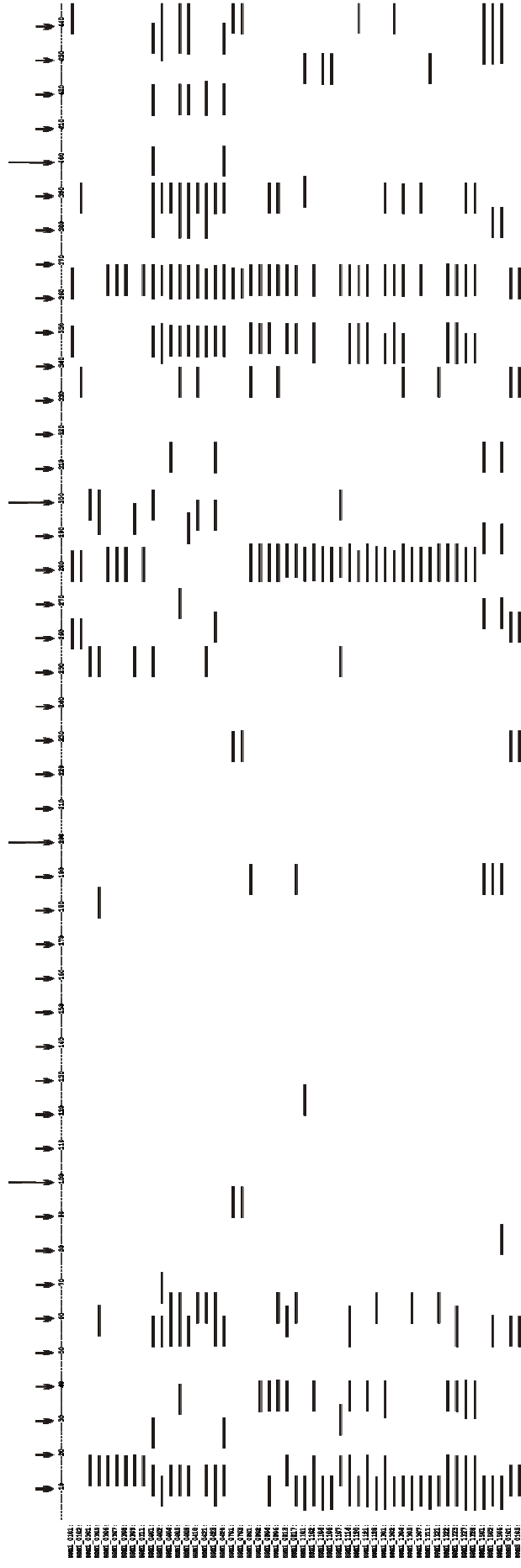


Figura 6. Análisis *in silico* de epítomos T con un umbral del 1% realizado con el programa ProPred para la proteína EhCP112

La línea continua representa la secuencia de aminoácidos de la proteína. Cada fila representa el análisis realizado para cada uno de los 51 alelos HLA-DR disponibles en la base de datos del programa ProPred. Las líneas discontinuas representan los epítomos identificados.

Tabla 8. Análisis de sitios de unión a las moléculas HLA-DR presentes en las proteínas EhADH112 y EhCP112 usando el programa ProPred

Proteína (No. de acceso NCBI)	Tamaño de la proteína	Análisis por ProPred para la unión a los alelos HLA-DR			
		No. de alelos unidos/ No de alelos evaluados		% de unión	% de unión
		Umbral ajustado al 3%	Umbral ajustado al 1%	Umbral ajustado al 3%	Umbral ajustado al 1%
EhADH112 (AAAF04256)	687 aminoácidos	51/51	50/51	100	98.03
EhCP112 (AAAF04255)	446 aminoácidos	51/51	51/51	100	100

7.2. Identificación de epítomos T promiscuos de las proteínas EhADH112 y EhCP112

Cuando se analizaron las regiones que contenían los epítomos de unión para los diferentes alelos HLA-DR, para cada una de las proteínas en cuestión se consideraron promiscuas aquellas que fueron reconocidas por más del 50% de los alelos de la base de datos del programa ProPred, utilizando un umbral del 3%.

Las regiones más promiscuas en la proteína EhADH112 fueron las siguientes: P1-ADH112(aa174-aa197), P2-ADH112(aa396-aa428), P3-ADH112(aa544-aa552), P4-ADH112(aa605-aa620) y P5-ADH112(aa659-aa670). **Tabla 9.** Mientras que para la proteína EhCP112, las regiones de mayor promiscuidad fueron: P1-CP112(aa360-aa371), P2-CP112(aa277-aa303), P3-CP112(aa331-aa354), P4-CP112aa4-aa20. **Tabla 9.**

Tabla 9. Regiones promiscuas de las proteínas EhADH112 y EhCP112

Péptido	Secuencia	Unión a los alelos HLA-DR			
		No. de alelos unidos/ No de alelos evaluados		% de unión	
		Umbral ajustado al 3%	Umbral ajustado al 1%	Umbral ajustado al 3%	Umbral ajustado al 1%
P1-ADH112	174- LQTLTTLALGCAHLIMHINAVAQG- 197	48/51	28/51	94.11	54.90
P2-ADH112	396-IPQDIIINANRLKQLNTYNSICQQMEFITTIEA-428	45/51	26/51	88.23	50.98
P3-ADH112	544- IKIYEKNEK- 552	27/51	18/51	52.94	35.29
P4-ADH112	605- ITGMVQRLRVAINAAD-620	37/51	17/51	72.54	33.33
P5-ADH112	659- LSMVRSITGNSQ- 670	39/51	19/51	76.47	37.25
P1-CP112	360- YIRIKTTNLCGI- 371	48/51	37/51	94.11	72.54
P2-CP112	277-MVLLLKLLHHYGPFLVSVKVSQTGFS- 303	51/51	41/51	100	80.39
P3-CP112	331- VVLMDGYRECVEYFIIRNSWASGW- 354	49/51	31/51	96.07	60.78
P4-CP112	4- IVVAFLLLVSQKTQSI- 20	51/51	43/51	100	84.71

7.3. Construcción de los genes sintéticos de los poliepitopos EhADH112 y EhCP112

La generación de los genes sintéticos para los poliepitopos EhADH112 y EhCP112 se realizaron mediante la técnica de PCR en dos etapas.

Los productos que se originaron en la primera reacción de PCR fueron de diversos tamaños, siendo mayoritarios aquellos que tenían un tamaño aproximado de 100 pares de bases. Sin embargo, también estaban presentes aquellos que contenían la secuencia codificante de los poliepitopos T diseñados para la EhADH112. (**Figura 7, carril 2**) y para la EhCP112 (**Figura 7, carril 6**)

En la segunda reacción de PCR usando los iniciadores específicos para cada gen se obtuvieron productos únicos con las tallas esperadas de 309 pb para el gen del poliepitopo T de la EhADH112 (**Figura 7, carril 4**) y de 267 pb para el gen del poliepitopo T de la EhCP112 (**Figura 7, carril 8**).

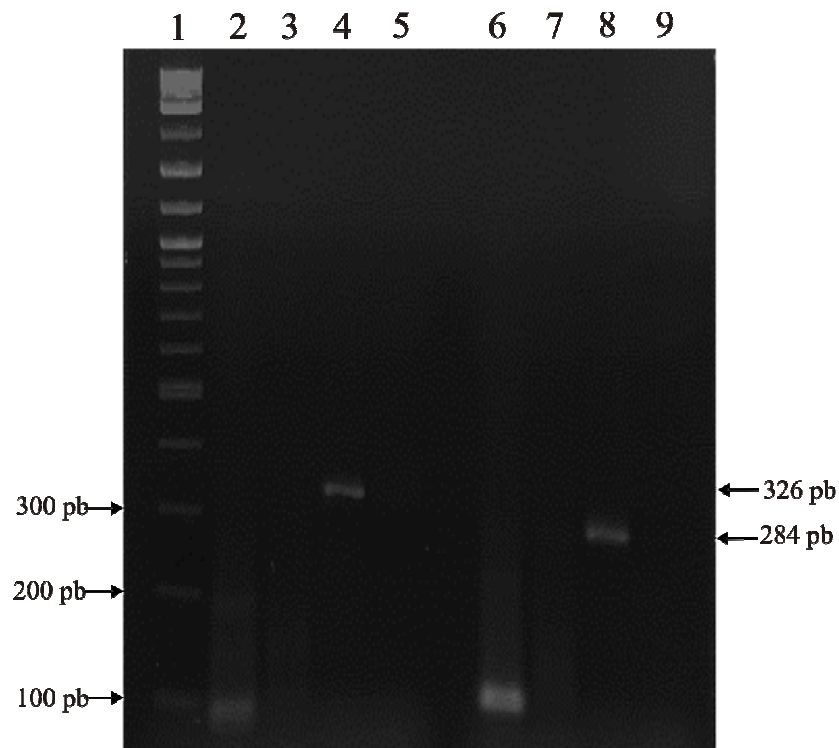


Figura 7. Perfil electroforético de los productos de PCR de los poliepitopos EhADH112 y EhCP112.

Carril 1: Marcador 2 log; *Carril 2:* Producto de PCR para el ensamble del gen sintético del poliepitopo T de la EhADH112; *Carril 3:* Control negativo de la PCR de ensamble para el gen sintético del poliepitopo T de la EhADH112; *Carril 4:* Producto de amplificación del gen sintético del poliepitopo T de la EhADH112; *Carril 5:* Control negativo de la PCR de amplificación del gen sintético del poliepitopo T de la EhADH112; *Carril 6:* Producto de PCR del ensamble para el gen sintético del poliepitopo T de la EhCP112; *Carril 7:* Control negativo de la PCR de ensamble para el gen sintético del poliepitopo T de la EhCP112; *Carril 8:* Productos de amplificación del gen sintético para el poliepitopo T de la EhCP112; *Carril 9:* Control negativo de la PCR de amplificación para el gen sintético del poliepitopo T de la EhCP112

7.4. Clonación de los genes sintéticos de los poliepítopos EhADH112 y EhCP112

El plásmido de expresión pGEX-6P-1 se extrajo de las bacterias transformantes *E. coli* DH5 α con el kit comercial FastPlasmid™, y se comprobó su integridad en gel de agarosa al 1%. **Figura 8**

El plásmido pGEX-6P-1 y los productos de la segunda PCR se sometieron a restricción con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I. En la **Figura 9 y 10** se muestra la restricción del plásmido pGEX-6P-1 y la restricción de los productos de PCR de amplificación.

Para conocer la concentración del vector y de los genes sintéticos restringidos para la reacción de ligación, se cuantificó en un gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 2 log con una concentración de 1 μ g por carril. En la **Figura 11**, se muestra la cuantificación del vector y genes sintéticos restringidos.

Los genes sintéticos restringidos se ligaron en el vector pGEX-6P-1 y se transformaron en células de *E. coli* DH5 α , de las colonias transformantes obtenidas se purificó el DNA plasmídico, el cual fue sometido a análisis de restricción con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xho* I para confirmar la presencia del inserto de interés. El análisis de restricción obtenido con el DNA plasmídico de las clonas positivas se muestra en la **Figura 12**.

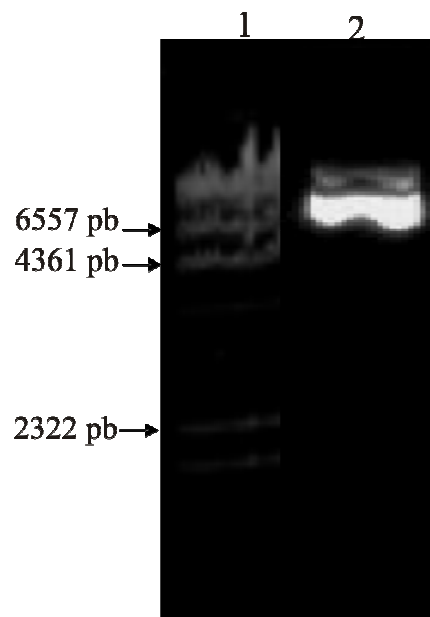


Figura 8. Perfil electroforético de la purificación del DNA plásmidico.

Carril 1: Marcador λ Hind III; Carril 2: Isoformas de la 1ª elución de la purificación del plásmido pGEX-6P-1 obtenidas por la técnica de miniprep con el kit comercial FastPlasmid.

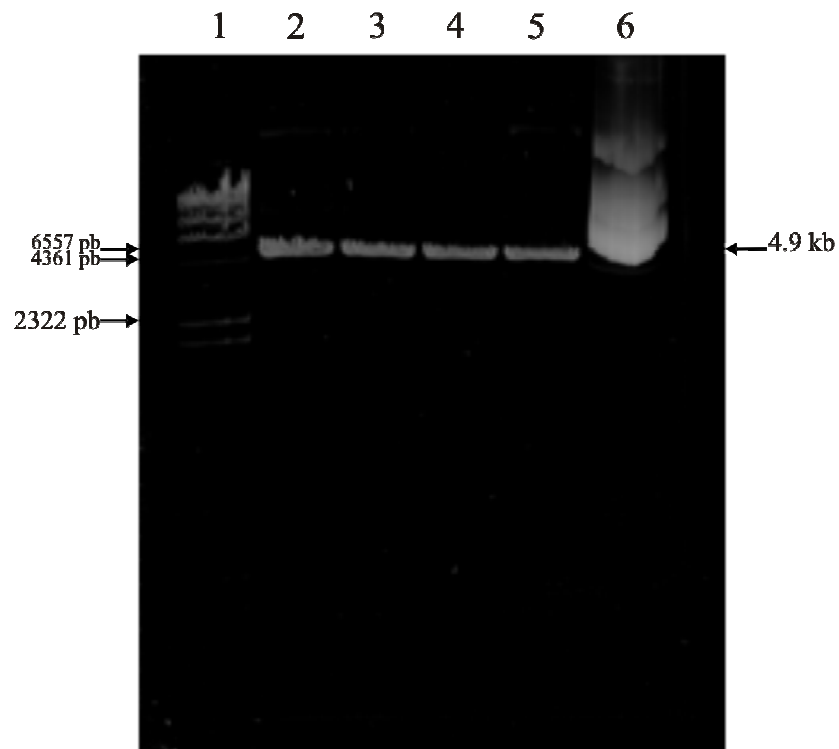


Figura 9. Perfil electroforético del análisis de restricción del plásmido pGEX-6P-1

Carril 1: Marcador molecular λ Hind III; Carril 2: Plásmido pGEX-6P-1 restringido con *EcoR* I; Carril 3: Plásmido pGEX-6P-1 restringido con *Xho* I; Carril 4,5: Plásmido pGEX-6P-1 restringido con *EcoR* I y *Xho* I; Carril 6: Plásmido pGEX-6P-1 sin restricción.

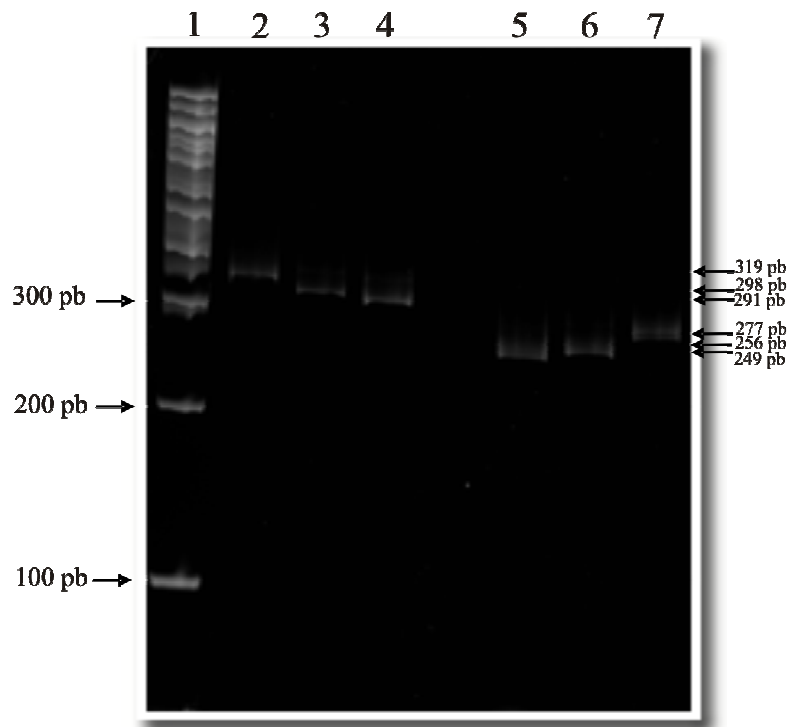


Figura 10. Perfil electroforético del análisis de restricción de los genes sintéticos de los poliepítopos EhADH112 y EhCP112

Carril 1: Marcador molecular 100 pb; carril 2: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhADH112 restringido con *EcoR* I; Carril 3: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhADH112 restringido con *Xho* I; Carril 4: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhADH112 restringido con *EcoR* I y *Xho* I; Carril 5: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhCP112 restringido con *EcoR* I y *Xho* I; Carril 6: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhCP112 restringido con *Xho* I; Carril 7: Producto de PCR de amplificación del poliepítopo EhCP112 restringido con *EcoR* I.

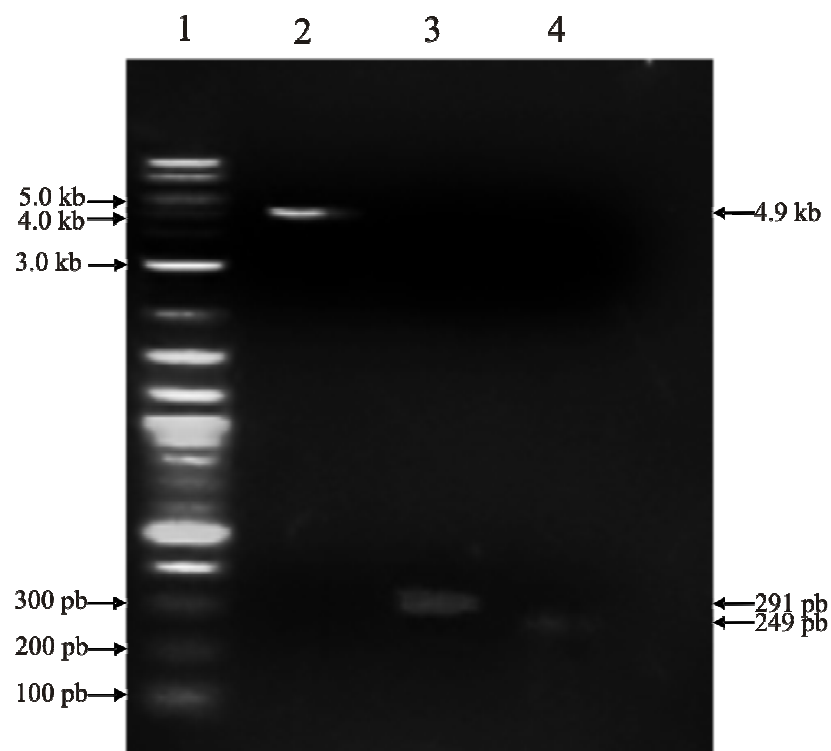


Figura 11. Perfil electroforético para la cuantificación del plásmido pGEX-6P-1 y genes sintéticos restringidos.

a) Carril 1: Marcador molecular 2 log (200pb→32 ng, 300 pb→ 37 ng, 5.0 kb→32 ng); Carril 2: Plásmido pGEX-6P-1 restringido con *EcoR* I y *Xho* I(40 ng); Carril 3: Gen sintético del polipéptido EhADH112 restringido con *EcoR* I y *Xho* I (6 ng); Carril 4: Gen sintético del polipéptido EhCP112 restringido con *EcoR* I y *Xho* I (4 ng).

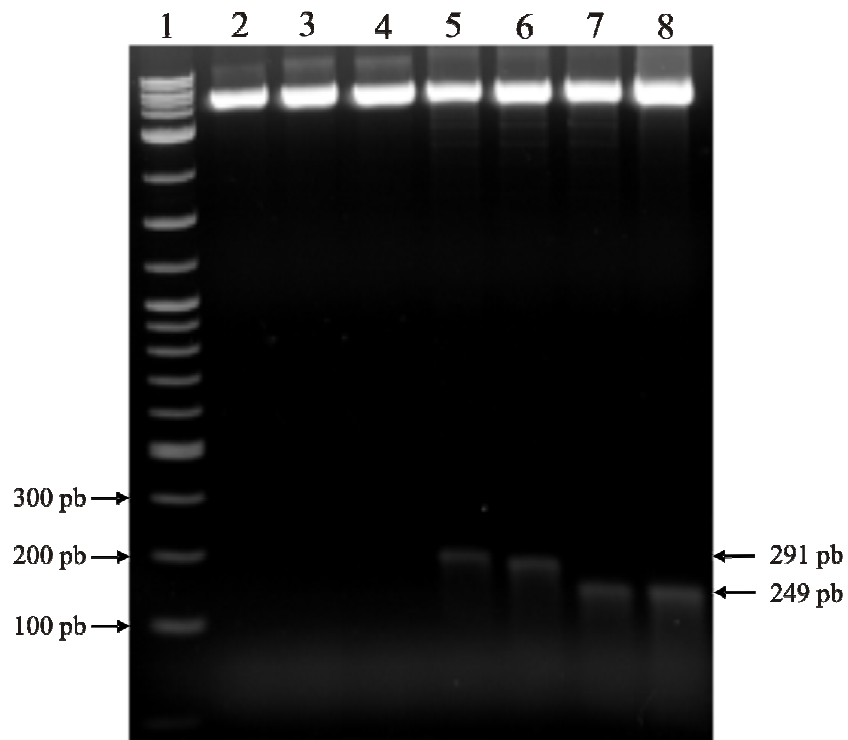


Figura 12. Análisis de restricción de clonas positivas.

Carril 1: Marcador molecular 2 log; Carril 2: Plásmido pGEX-6p-1 restringido con la enzima *EcoR* I; Carril 3: Plásmido pGEX-6p-1 restringido con la enzima *Xho* I; Carril 4: Plásmido pGEX-6p-1 restringido con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I. Carril 5,6: DNA plasmídico de las clonas positivas restringidas con *EcoR* I y *Xho* I que liberaron un fragmento de 291 pb que codifica para el polipéptido de la EhADH112. Carril 7,8: DNA plasmídico de las clonas positivas restringidas con *EcoR* I y *Xho* I que liberaron un fragmento de 249 pb que codifica para el polipéptido de la EhCP112.

7.5. Secuenciación de los genes sintéticos de los poliepítopos EhCP112 y EhADH112

clonados en el vector pGEX-6P-1

Al DNA plasmídico de las clonas positivas para el gen del poliepítopo EhADH112, se le realizó secuenciación automatizada, así como un análisis de alineamiento múltiple para corroborar: que el fragmento clonado estuviera en marco de lectura respecto al vector, verificar su identidad e integridad. El fragmento clonado contenía 291 pb correspondiente al tamaño esperado para el gen del poliepítopo EhADH112, así mismo la identidad correspondió a su diseño. La secuencia nucleotídica se observa en la **Figura 13**.

Posteriormente con la secuencia obtenida del gen del poliepítopo EhADH112 se le hizo la traducción con el programa GeneRunner para obtener la secuencia aminoacídica y un alineamiento múltiple con la secuencia del diseño *in silico*. En la **Figura 14** se puede observar que el inserto clonado corresponde efectivamente a la secuencia aminoacídica del poliepítopo EhADH112.

De igual forma, el DNA plasmídico de las clonas positivas para el poliepítopo EhCP112 se secuenciaron, y también se le realizó un análisis de alineamiento múltiple para corroborar que estuvieran en marco de lectura respecto al vector, su identidad e integridad. En la **Figura 15** se puede observar que la secuencia nucleotídica corresponde a la secuencia nucleotídica del poliepítopo EhCP112 a excepción de los nucleótidos señalados en rojo. Posteriormente, a la secuencia del gen del poliepítopo EhCP112, se le hizo la traducción con el programa GenRuner para obtener la secuencia aminoacídica y se hizo un alineamiento múltiple con la secuencia del diseño *in silico*. En la **Figura 16** puede observarse que el inserto clonado corresponde efectivamente a la secuencia aminoacídica del poliepítopo EhCPH112 a excepción de los aminoácidos señalados por la caja de color amarilla.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment
pGEX-6P-1-ADH5      GAGTGGCGACCATCCTCCAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCC
Polyepit-T-ADH      -----

pGEX-6P-1-ADH5      CCGGAATTCCTGCAGACCCTGACCACCCTGGCGCTGGGCTGCGCGCATCTGATTATGCAT
Polyepit-T-ADH      ---GAATTCCTGCAGACCCTGACCACCCTGGCGCTGGGCTGCGCGCATCTGATTATGCAT
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      ATTAACGCGGTGGCGCAGGGCATTCCGCAGGATATTATTATTAAACGCGAACCGCCTGAAA
Polyepit-T-ADH      ATTAACGCGGTGGCGCAGGGCATTCCGCAGGATATTATTATTAAACGCGAACCGCCTGAAA
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      CAGCTGAACACCTATAACAGCATTGCGCAGCAGATGGAATTATTACCACCATTGAAGCG
Polyepit-T-ADH      CAGCTGAACACCTATAACAGCATTGCGCAGCAGATGGAATTATTACCACCATTGAAGCG
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      ATTAATAATTTATGAAAAAACGAAAAAATTACCGGCATGGTGCAGCGCCTGCGCGTGGCG
Polyepit-T-ADH      ATTAATAATTTATGAAAAAACGAAAAAATTACCGGCATGGTGCAGCGCCTGCGCGTGGCG
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      ATTAACGCGGCGGATCTGAGCATGGTGCAGCATTACCGGCAACAGCCAGTAACTCGAG
Polyepit-T-ADH      ATTAACGCGGCGGATCTGAGCATGGTGCAGCATTACCGGCAACAGCCAGTAACTCGAG
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      CGGCCGCATCGTGA CTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAAAC
Polyepit-T-ADH      -----

pGEX-6P-1-ADH5      CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC
Polyepit-T-ADH      -----

```

Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de DNA del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del polipéptido EhADH112.

El alineamiento múltiple realizado con la secuenciación de DNA obtenida del plásmido con el inserto del polipéptido EhADH112, mostró estar dentro del marco de lectura respecto al vector, secuencia y tamaño correspondientes.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment
pGEX-6P-1-ADH5      EWRPSSKSDLEVLFQGGLGSPEFLQTLTTLALGCAHLIMHINAVAQGIPQDIIINANRLK
Polyepit-T-ADH      -----EFLQTLTTLALGCAHLIMHINAVAQGIPQDIIINANRLK
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      QLNTYNSICQQMEFITTIEAIIYEKNEKITGMVQRLRVAINAADLSMVR SITGNSQ#LER
Polyepit-T-ADH      QLNTYNSICQQMEFITTIEAIIYEKNEKITGMVQRLRVAINAADLSMVR SITGNSQ#LE-
                      *****

pGEX-6P-1-ADH5      PHRDLTICLARFGDDGENLHMQLPETVTACLADAGSRQARQGASAGVGGCRCGAAMTQSRS
Polyepit-T-ADH      -----

pGEX-6P-1-ADH5      DSGVNSRRKGLVIRLFLVNVMIIMVSTSGGTFRGNVRGTPICLFFIHSNMYPLMRHNP
Polyepit-T-ADH      -----

```

Figura 14. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítipo EhADH112.

El alineamiento múltiple realizado con la secuencia de aminoácidos del poliepítipo EhADH112, clonado en el plásmido y la secuencia diseñada *in silico*, mostró que dicha secuencia esta dentro del marco de lectura respecto al vector, así como también la secuencia esta integra

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment
pGEX-6P-1-CP5      GGCTACAACGTCAAATCGGACTGGAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCCGGAATT
Polyepit-T-CP      -----GAATT
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      CTATATTCGCATTAAAACCAACCAACCTGTGCGGCATTATGGTGCTGCTGCTGAAAAAACT
Polyepit-T-CP      CTATATTCGCATTAAAACCAACCAACCTGTGCGGCATTATGGTGCTGCTGCTGAAAAAACT
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      GCTGCATCATTATGGCCCGTTTCTGGTGAGCGTGAAAGTGAGCGGCACCGGCTTTAGCGT
Polyepit-T-CP      GCTGCATCATTATGGCCCGTTTCTGGTGAGCGTGAAAGTGAGCGGCACCGGCTTTAGCGT
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      GGTGCTGATGGATGGCTATCGGAATGCGTGGAATATTTTATTATTCGCAACAGCTGGGC
Polyepit-T-CP      GGTGCTGATGGATGGCTATCGGAATGCGTGGAATATTTTATTATTCGCAACAGCTGGGC
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      GAGCCACTGGATTGTGGTGGCGTTTCTGCTGCTGGTGAGCAACCAGAAAACCCAGAGCAT
Polyepit-T-CP      GAGCCCTGGATTGTGGTGGCGTTTCTGCTGCTGGTGAGCAACCAGAAAACCCAGAGCAT
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      TTAACTCGAGCGGCCGATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
Polyepit-T-CP      TTAACTCGAG-----
                                     *****

pGEX-6P-1-CP5      CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
Polyepit-T-CP      -----

pGEX-6P-1-CP5      TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGC
Polyepit-T-CP      -----

```

Figura 15. Alineamiento múltiple de la secuencia de DNA del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepítipo EhCP112.

El alineamiento múltiple, realizado con la secuenciación de DNA obtenida del plásmido con el inserto del poliepítipo EhCP112 y la secuencia, mostraron la inserción de dos mutaciones puntuales, las cuales son señaladas con cajas de color rojo.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment
pGEX-6P-1-CP5      ATTSNRTGVLFQGPLGSPEFYIRIKTTNLCGIMVLLLKKLLHHYGPFLVSVKVSGTGFSV
Polyepit-T-CP      -----EFYIRIKTTNLCGIMVLLLKKLLHHYGPFLVSVKVSGTGFSV
                      *****

pGEX-6P-1-CP5      VLMDGYRECVEYFIIRNSWASDWIVVAFLLLVSNQKTQSI#LERPHRDLTICLARFGDDGE
Polyepit-T-CP      VLMDGYRECVEYFIIRNSWASGWIVVAFLLLVSNQKTQSI#LE-----
                      *****

pGEX-6P-1-CP5      NLHMQLPETVTACLAAGSRQARQGASAGVGGCRGAAMTQSRSDSGVYNSRRKGLVIRLF
Polyepit-T-CP      -----

```

Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del polipéptido EhCP112.

El alineamiento múltiple realizado con la secuencia de aminoácidos del polipéptido EhCP112 clonado en el plásmido y la secuencia teórica mostró la substitución de glicina (G) por ácido aspártico (D), la cual se señala con la caja de color amarillo. El resto de la secuencia esta dentro del marco de lectura y corresponde a la secuencia esperada.

7.6. Purificación de los poliepitopos recombinantes

Para expresar los poliepitopos recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3) plysE, las bacterias se transformaron con los plásmidos que previamente se secuenciaron. La expresión se visualizó en membranas de nitrocelulosa teñidas con Rojo Ponceau. **Figura 17**

Las bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 vacío sobre-expresaron una proteína de 28378 Da, 25653 Da correspondientes a la etiqueta de GST, 996 Da de la secuencia del sitio de corte de la enzima PreScission™ Protease y 517 Da de la secuencia de aminoácidos del sitio de multiclonación. Las bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1-poliepitopo EhCP112, sobre-expresó un polipéptido de 36 kDa, 26 kDa correspondientes a la etiqueta de GST y 10 kDa correspondientes al poliepitopo EhCP112. **Figura 17**

Las bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1-poliepitopo EhADH112, sobre-expresaron un polipéptido de 37 kDa, 26 kDa correspondientes a la etiqueta de GST y 11 kDa correspondientes al poliepitopo EhADH112. **Figura 17**

En las bacterias que contenían el plásmido correspondiente y no se le agregó IPTG, no se observó la sobre-expresión de las proteínas de interés. Los pesos moleculares de los poliepitopos sobre-expresados corresponden a los pesos moleculares teóricos. **Figura 17**

Con el fin de corroborar la presencia de la etiqueta de GST y que las proteínas sobre-expresadas eran efectivamente las proteínas de interés se realizó una inmunodetección. Para esto se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-GST el cual reconoció de manera específica a la etiqueta de GST (28 kDa) del vector vacío y la etiqueta de GST fusionada a los poliepitopos recombinantes EhCP112 (36 kDa) y EhADH112 (37 kDa), todos presentaron una sola banda la cual correspondió al peso molecular esperado. **Figura 18.**

En las bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1-poliepítipo EhCP112 o el plásmido pGEX-6P-1-poliepítipo EhADH112, y no se le adicionó IPTG no se observó la expresión de la etiqueta de GST **Figura 18**.

Para saber si los poliepítopos eran solubles o se encontraban en cuerpos de inclusión se realizó una prueba de solubilidad, dónde se identificó que la GST y los poliepítopos recombinantes se encontraban predominantemente en la fracción insoluble lo que sugirió fuertemente la formación de cuerpos de inclusión. En la **Figura 19** se muestra la prueba de solubilidad dónde puede observarse que en las fracciones insolubles se encuentran predominantemente; la etiqueta de GST 28 kDa, el poliepítipo recombinante EhCP112 36 kDa y el epítipo recombinante EhADH 37 kDa.

Para realizar la purificación de las proteínas recombinantes se utilizó un método “Batch” por afinidad a glutatión sepharosa. La GST y los poliepítopos recombinantes como se observó anteriormente en la prueba de solubilidad son predominantemente insolubles, por lo se tuvo que hacer uso de agentes desnaturalizantes para la solubilización como el Sarcosyl, así como el uso de Triton X-100 para renaturalizar y restablecer la actividad enzimática de la etiqueta de GST. En la **Figura 20** se observa como la etiqueta de GST de 28 kDa fue purificada por afinidad a glutatión sepharosa, sin embargo los poliepítopos recombinantes no se pudieron purificar por este método ya que probablemente presentaron una afinidad muy débil a la glutatión sepharosa. **Figura 21**

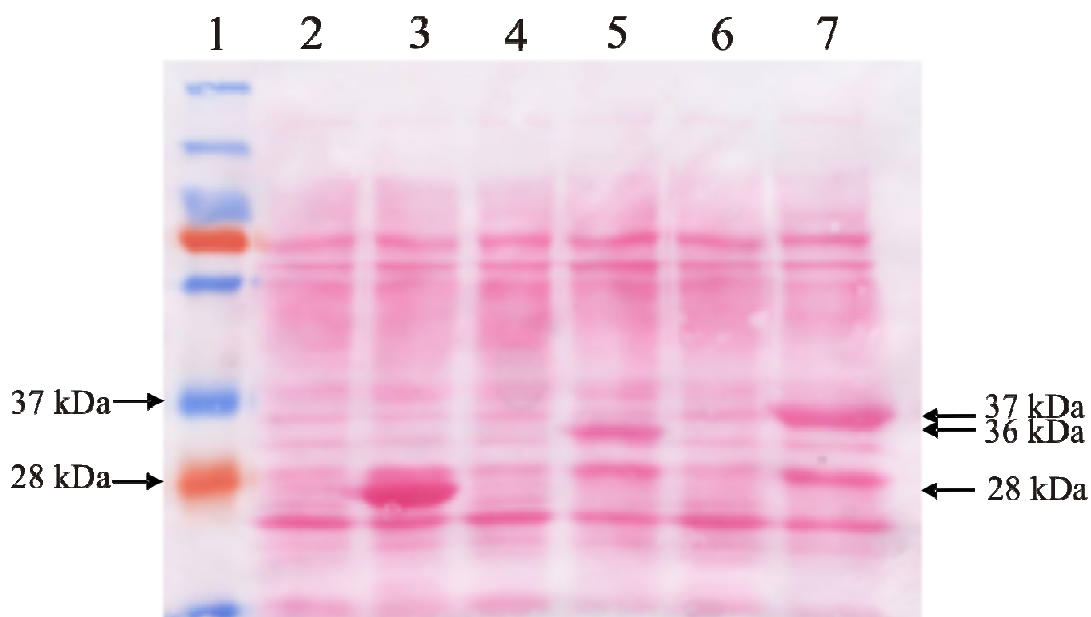


Figura 17. Análisis de inducción de los poliepitopos recombinantes.

Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; Carril 2: Extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 vacío sin inducir; Carril 3: Extracto bacteriano que contenían el plásmido pGEX-6P-1 inducido con IPTG 1mM; Carril 4: Extracto sin inducir de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el poliepitopo EhCP112; Carril 5: Extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el poliepitopo EhCP112; Carril 6: Extracto sin inducir de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el poliepitopo EhADH112; Carril 7: Extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el poliepitopo EhADH112.

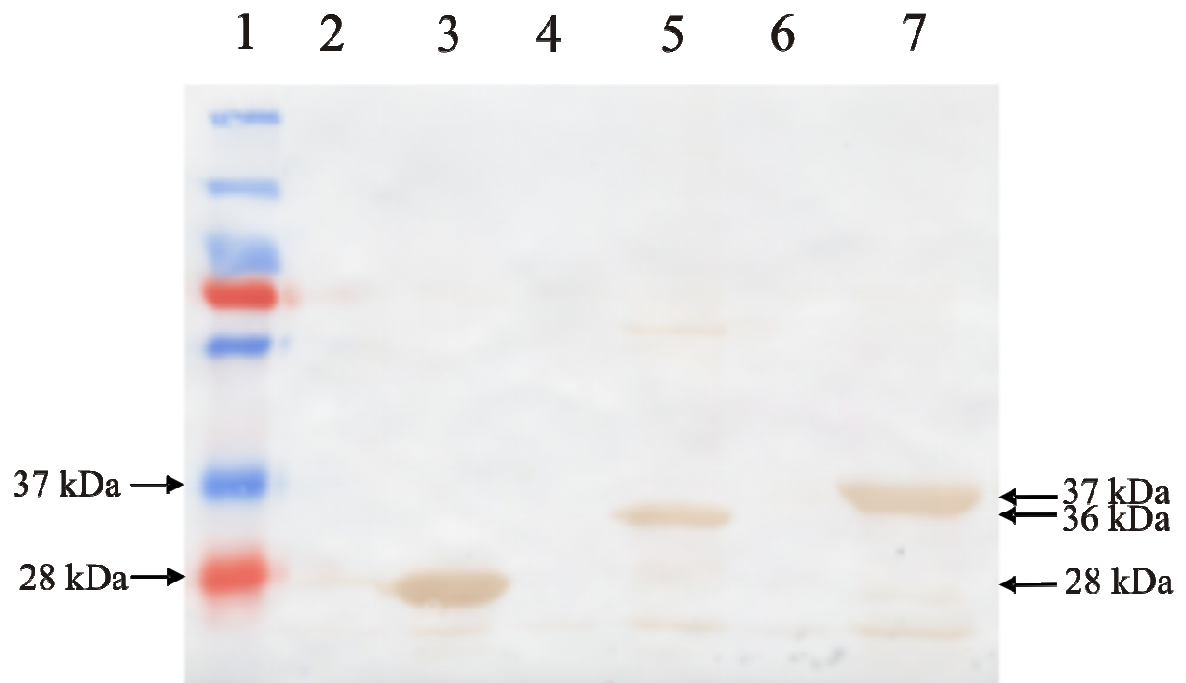


Figura 18. Inmunodetección de la etiqueta de GST.

Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; Carril 2: Extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 vacío sin inducir; Carril 3: Extracto bacteriano que contenían el plásmido pGEX-6P-1 inducido con IPTG 1mM; Carril 4: Extracto sin inducir de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhCP112; Carril 5: Extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhCP112; Carril 6: Extracto sin inducir de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhADH112; Carril 7: Extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhADH112.

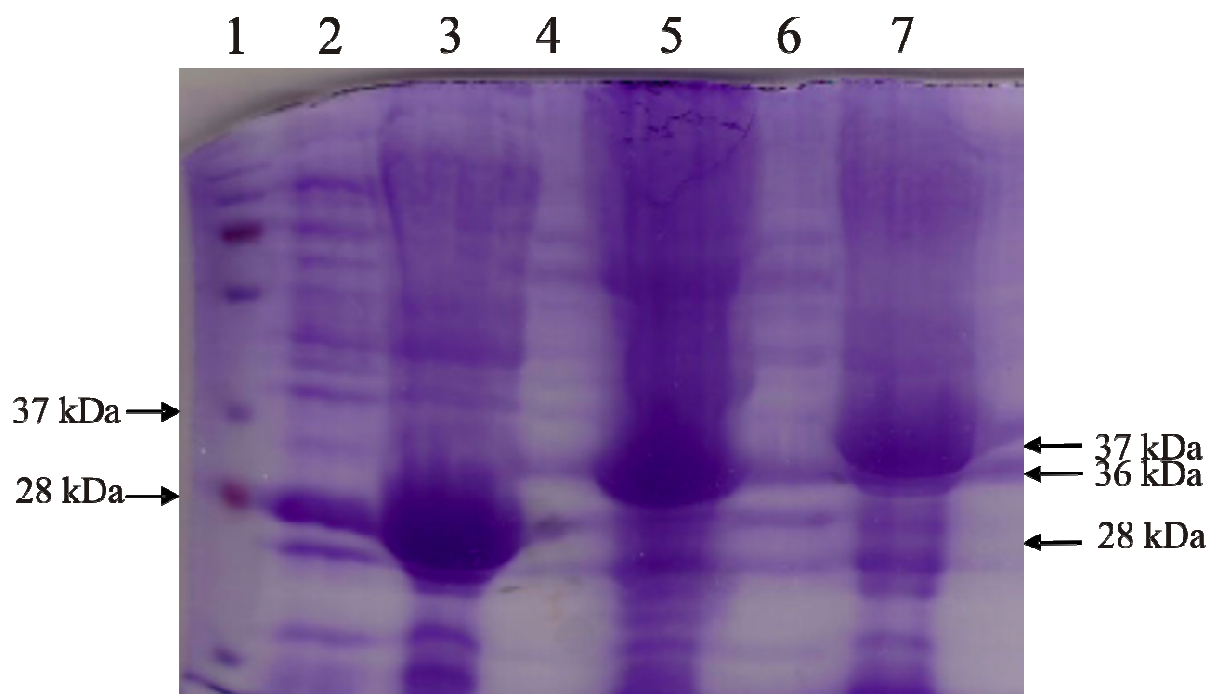


Figura 19. Prueba de solubilidad.

Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; Carril 2: Fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 inducido con IPTG 1mM; Carril 3: Fracción insoluble del extracto bacteriano que contenían el plásmido pGEX-6P-1 inducido con IPTG 1mM; Carril 4: Fracción soluble del extracto de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhCP112 inducido con IPTG 1mM; Carril 5: Fracción insoluble del extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhCP112; Carril 6: Fracción soluble del extracto de bacterias que poseían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhADH112 inducido con IPTG 1 mM; Carril 7: fracción insoluble del extracto de bacterias inducido con IPTG 1mM en bacterias que contenían el plásmido pGEX-6P-1 con el polipéptido EhADH112.

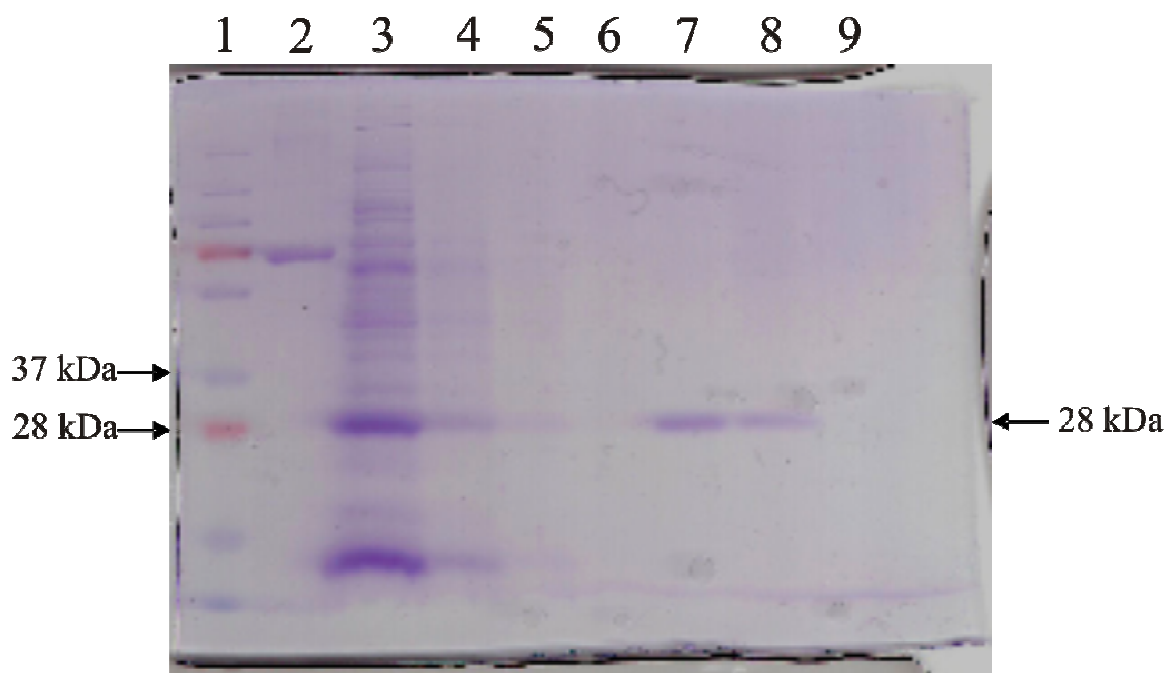


Figura 20. Purificación de la GST por afinidad a glutatión sepharosa.

Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; Carril 2: Albumina (1μg) Carril 3: Fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; Carril 4: Primer lavado de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; Carril 5: Segundo lavado de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; Carril 6: Tercer lavado de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; Carril 7: Primera elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; 8: Segunda elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1; 9: Tercera elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1.

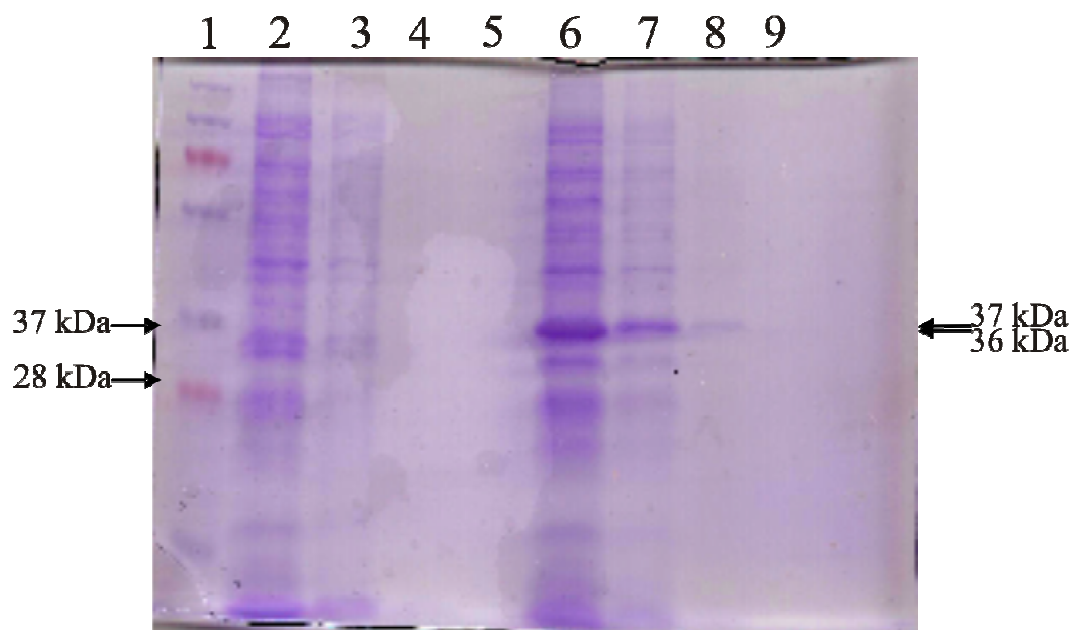


Figura 21. Purificación de los poliepitopos EhCP112 y EhADH112 por afinidad a glutatión sepharosa.

Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; Carril 2: Fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhCP112; 3: Primer lavado de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhCP112; Carril 4: Primera elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhCP112; Carril 5: Segunda elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhCP112; Carril 6: Fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhADH112; 7: Primer lavado de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhADH112; Carril 8: Primera elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhADH112; Carril 9: Segunda elución de la fracción soluble del extracto de bacterias con el plásmido pGEX-6P-1 con el inserto del poliepitopo EhADH112.

7.7. Evaluación de la respuesta inmune humoral

El suero que se obtuvo de los hámsteres que recibieron los poliepítopos recombinantes, se empleó para detectar la presencia de IgGs anti-poliepítopos EhCP112 y EhADH112 recombinantes mediante ELISA.

El suero obtenido cada 15 días de estos animales nos permitió hacer una cinética de la respuesta humoral. El resultado de este experimento mostró que el nivel de anticuerpos séricos anti-poliepítopos se comportó con una tendencia creciente en el transcurso de los días y durante las inmunizaciones previstas en el esquema de inmunización.

Comparativamente, los animales inmunizados con el poliepítopo EhADH112 mostraron mayores niveles de anticuerpos IgG una mejor respuesta a los 45 días de inmunización que los animales que recibieron el poliepítopo EhCP112. Estos resultados pueden observarse en la **Figura 22**.

Por otro lado el suero que se obtuvo de los hámsteres que recibieron los poliepítopos, se empleó para detectar la presencia de IgGs anti-péptidos sintéticos (epítopos) de la EhADH 112 y la EhCP112 mediante ELISA. El suero obtenido a los 45 días de estos animales nos permitió hacer una evaluación de la respuesta humoral.

El resultado de este experimento mostró que los niveles de anticuerpos séricos anti-epítopos presentaban diferencia significativa ($p < 0.05$) en respuesta inmune humoral siendo ésta menor en relación a la obtenida con los poliepítopos T recombinantes.

Por otra parte, el suero de los animales inmunizados con los poliepítopos EhADH112 y EhCP112 sugiere una respuesta inmune cruzada con la etiqueta de GST. **Figura 23**.

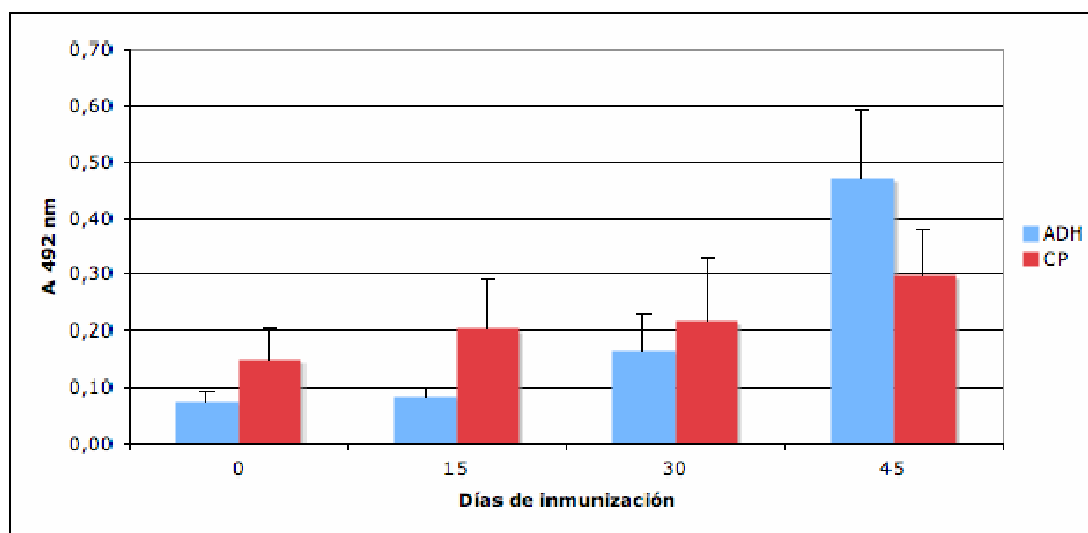


Figura 22. Respuesta inmune humoral en los hámsteres inmunizados con los poliepítopos EhCP112 y EhADH112.

Niveles de anticuerpos IgG séricos anti-poliepítopos presente a los días 0, 15, 30 y 45 de inmunización determinados mediante un ensayo de ELISA. Los promedios de los valores de las $D.O_{492}$ alcanzados por los sueros (1:100) de los animales inmunizados con los poliepítopos EhCP112 ■ y EhADH112 ■, muestran que a 45 días de inmunización se presenta el mayor título de anticuerpos, siendo mejor la respuesta inmune humoral para el poliepítopo EhADH112.

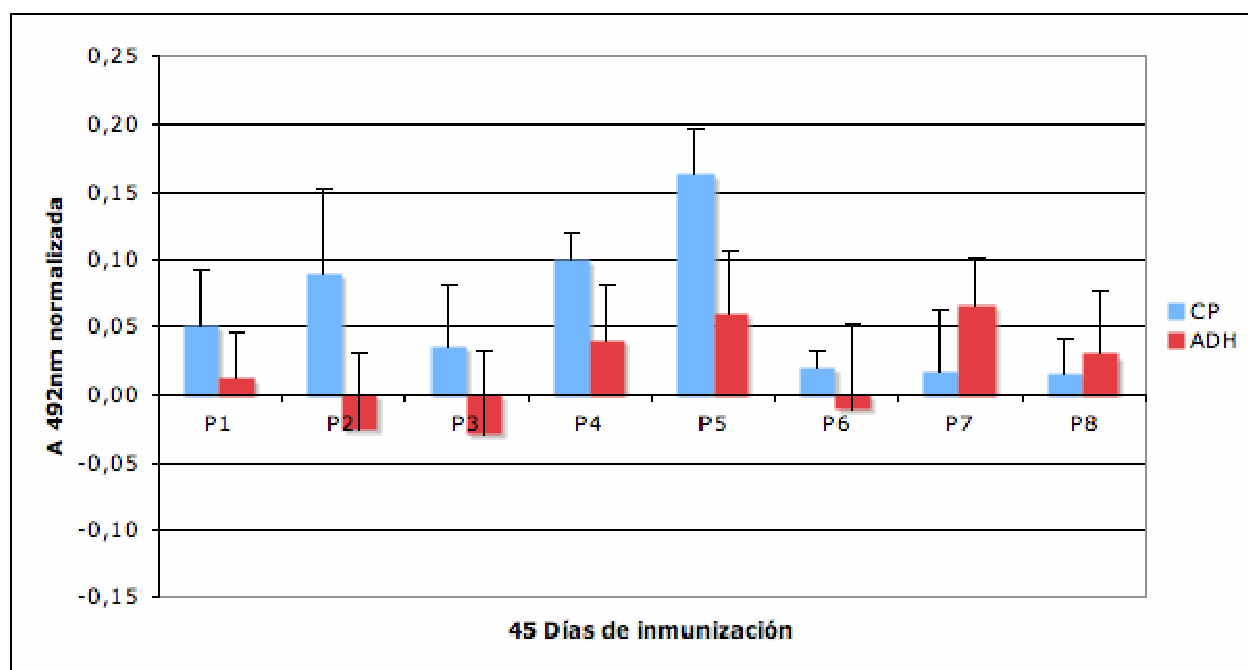


Figura 23. Respuesta inmune humoral en los hámsteres inmunizados con los poliepitopos EhCP112 y EhADH112 contra péptidos sintéticos.

Niveles de anticuerpos IgG séricos anti-epítomos presente a los días 45 de inmunización determinados mediante un ensayo de ELISA.

Los promedios de los valores de las D.O₄₉₂ normalizadas, del uso de los sueros (1:100) de los animales inmunizados con los poliepitopos EhCP112 ■ y EhADH112 ■ muestran que a los 45 días de inmunización se presentó un título de anticuerpos menor que los poliepitopos recombinantes.

7.8. Evaluación de la respuesta inmune celular en los hámsteres inmunizados con los poliepítopos recombinantes.

Con el objetivo de estudiar la participación de la respuesta celular de los hámsteres que habían sido inmunizados con el poliepítopo recombinante EhCP112 se realizaron ensayos de proliferación celular. El resultado de este experimento evidenció una proliferación celular del grupo inmunizado con el poliepítopo EhCP112, cuándo se estimuló de forma independiente con 10 µg/ml de los péptidos sintéticos (epítopos) mostrados en la **Tabla 10**.

Cuando se analizó el índice de proliferación celular del grupo estimulado con respecto al grupo control (no estimulado), se encontraron índices de estimulación de: 5.7, 4.0, 7.4 y 7,6 para los epítopos P1, P2, P3 y concanavalina A respectivamente. Se consideró que había una proliferación celular positiva cuando el índice de estimulación era mayor a 2. **Figura 24**.

Así mismo el resultado de este experimento evidenció una proliferación celular del grupo inmunizado con el poliepítopo EhADH112, cuándo se estimuló de forma independiente con 10 µg/ml de los péptidos sintéticos (epítopos) mostrados en la **Tabla 10**. Cuando se analizó el nivel de proliferación celular del grupo estimulado con respecto al grupo control (no estimulado), se encontraron índices de estimulación de: 12.4, 10.7, 9.9, 8.9, 9.9 y 12.3 para los epítopos P1, P2, P3, P4, P5 y concanavalina A respectivamente. **Figura. 25**

Tabla 10. Epítomos T de la EhCP112 evaluados en los ensayos de linfoproliferación

Péptido	Secuencia
P1	YIRIKTTNLC
P2	MVLLLKKLL
P3	FLVSVKVSGTGFS

Tabla 11. Epítomos T de la EhADH112 evaluados en los ensayos de linfoproliferación

Péptido	Secuencia
P1	LQTLTTLAL
P2	LIMHINAVAQG
P3	IINANRLKQ
P4	LNTYNSICQ
P5	MEFITTIEA

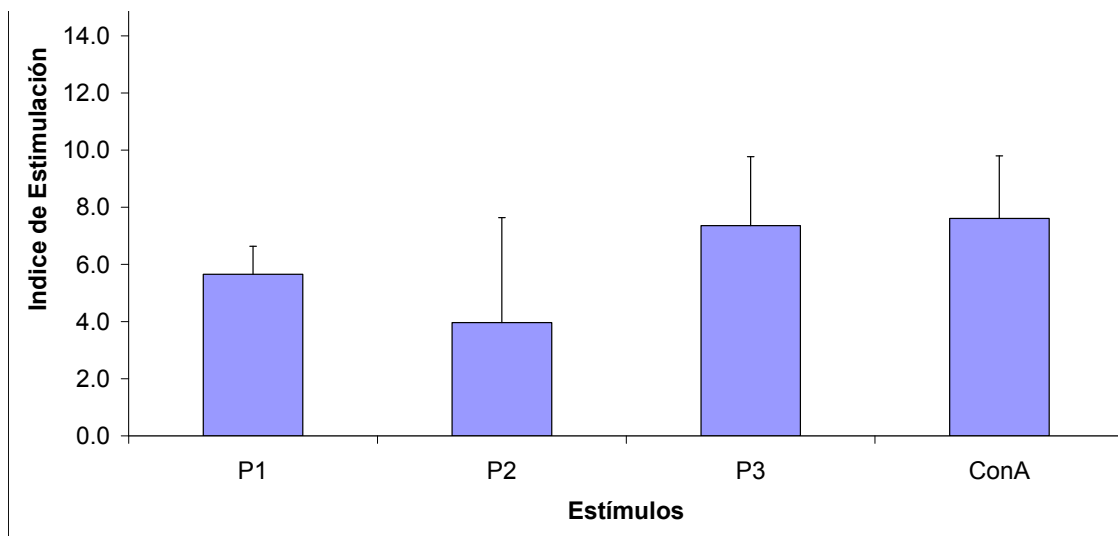


Figura 24. Respuesta proliferativa de los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepitopo recombinante EhCP112.

Los esplenocitos estimulados *in vitro* con los péptidos sintéticos P1, P2, P3 y Concanavalina A, en un ensayo de linfoproliferación en el que se midió la absorbancia producida por la ruptura de la sal de tetrazolium que dio origen al producto coloreado llamado FORMAZAN.

Los valores representan la media del índice de estimulación alcanzadas por los esplenocitos de los hámsteres que conforman el mismo grupo (n=5) y las líneas indican la desviación estándar. Como control positivo se utilizó Concanavalina A y como control negativo se utilizaron células sin estímulo.

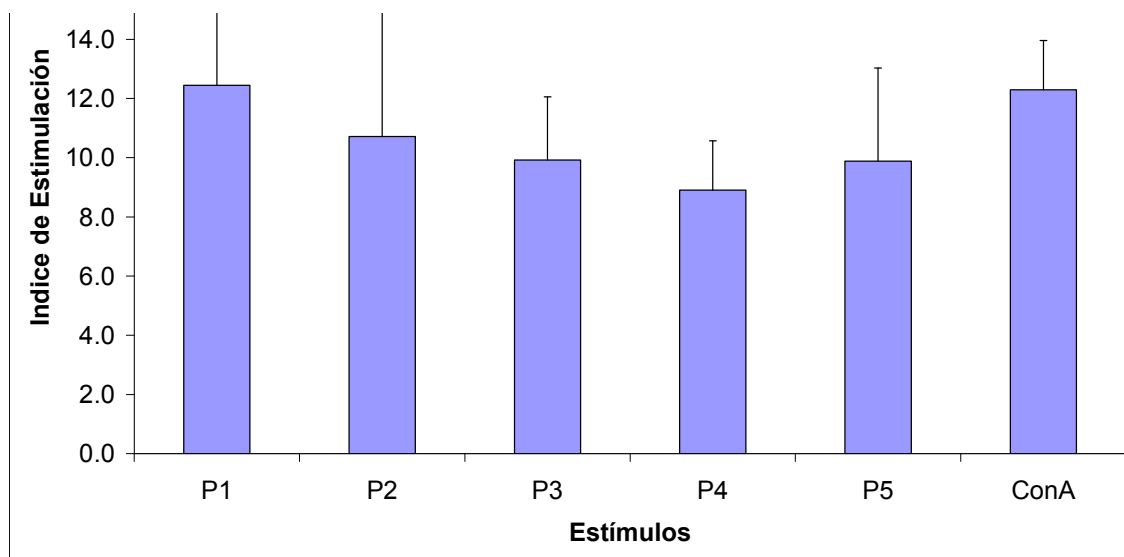


Figura 25. Respuesta proliferativa de los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítopo recombinante EhADH112.

Los esplenocitos estimulados *in vitro* con los péptidos sintéticos P1, P2, P3, P4, P5 y Concanavalina A, en un ensayo de linfoproliferación en el que se midió la absorbancia producida por la ruptura de la sal de tetrazolium que dio origen al producto coloreado llamado FORMAZAN.

Los valores representan la media del índice de estimulación alcanzadas por los esplenocitos de los hámsteres que conforman el mismo grupo (n=5) y las líneas indican la desviación estándar. Como control positivo se utilizó Concanavalina A y como control negativo se utilizaron células sin estímulo.

7.8.1. Evaluación del perfil de citocinas expresadas en esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítotope EhCP112

Con el objetivo de caracterizar el tipo de respuesta celular que se desarrollo mediante el estímulo de los epítotos de la EhCP112 mostrados en la **Tabla 10**, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión del IFN- γ e IL-4.

En este experimento se evidenció una relación IFN- γ /IL-4 de: 30.3, 15.0 y 22.7 para los epítotos P1, P2, y P3 de la EhCP112, estas relaciones sugirieron una expresión predominante del IFN- γ , lo cual señala que la respuesta inmune celular estimulada por dichos epítotos es del tipo Th1.

Figura 26

Por otro lado, al caracterizar que tipo de respuesta celular se desarrollo mediante el estímulo de los epítotos de la EhADH112 mostrados en la Tabla 10, se obtuvieron las siguientes relaciones de IFN- γ /IL-4, 28.6, 32.8, 31.8, 8 y 21.6 para los epítotos P1, P2, P3, P4 y P5 de la EhADH112 (**Tabla 11**), estas relaciones de igual manera sugirió una expresión predominante del IFN- γ .

Figura 27

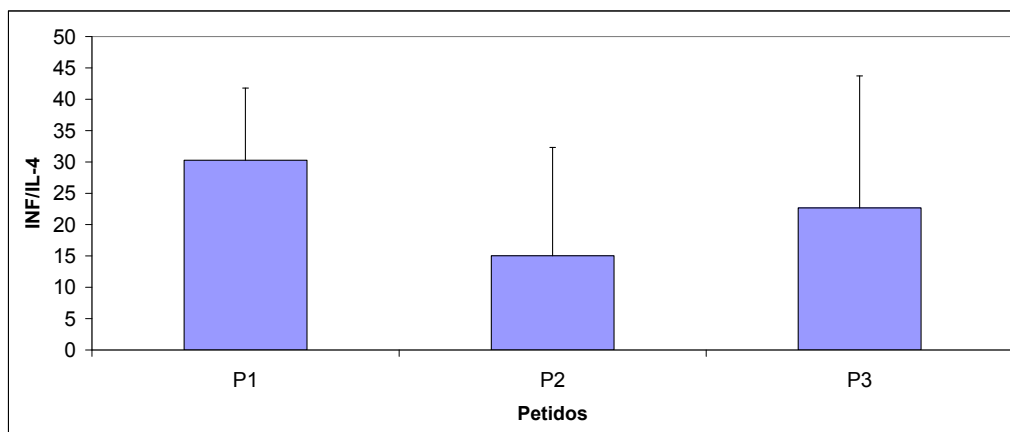


Figura 26. Perfil de citocinas expresadas en los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítipo recombinante EhCP112.

En el análisis de expresión de las citocinas IFN- γ e IL-4 en los eplenocitos estimulados *in vitro* con los péptidos sintéticos P1, P2 y P3 de la proteína EhCP112 muestran una relación de expresión IFN- γ /IL-4 de 30.3, 15.0 y 22.7 respectivamente.

Los valores representan la media de la relación de expresión IFN- γ /IL-4 alcanzadas en los esplenocitos de los hámsteres que conforman el mismo grupo (n=5) y las líneas indican la desviación estándar. La expresión esta normalizada respecto a la expresión del gen constitutivo *hprt*.

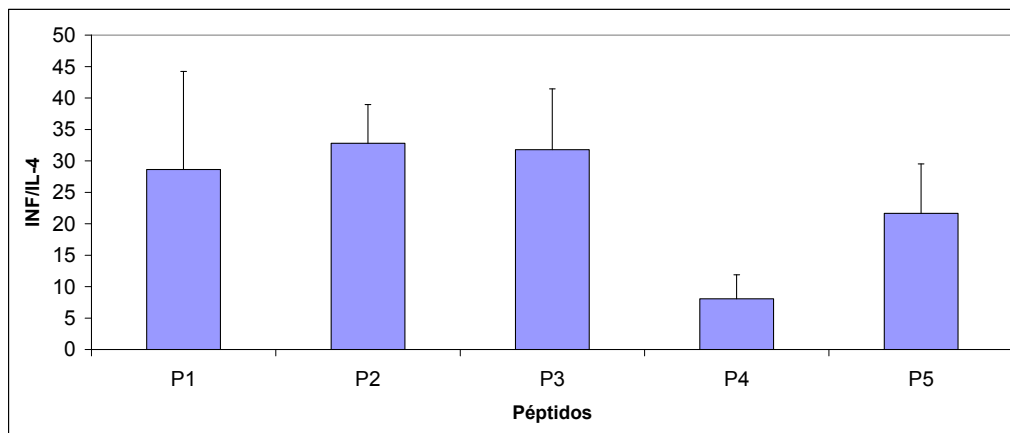


Figura 27. Perfil de citocinas expresadas en los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con el poliepítipo recombinante EhADH112.

En el análisis de expresión de las citocinas IFN- γ e IL-4 en los eplenocitos estimulados *in vitro* con los péptidos sintéticos P1, P2, P3, P4 y P5 de la proteína EhADH112 muestran una relación de expresión IFN- γ /IL-4 de 28.6, 32.8, 31.8, 8 y 21.6 respectivamente.

Los valores representan la media de la relación de expresión IFN- γ /IL-4 alcanzadas en los esplenocitos de los hámsteres que conforman el mismo grupo (n=5) y las líneas indican la desviación estándar. La expresión esta normalizada respecto a la expresión del gen constitutivo hprt.

8. Discusión

E. histolytica tiene un ciclo de vida simple, infecta solamente a humanos, es extracelular en todo su ciclo, además no se ha reportado que presente variación antigénica, por lo que todo lo anterior provee de entusiasmo para el desarrollo de una vacuna contra la amibiasis, de hecho que el humano sea el único hospedero definitivo para *E. histolytica*, posee una gran ventaja ya que si una vacuna pudiera proteger efectivamente de la infección de *E. histolytica* en humanos susceptibles se podría erradicar esta parásitosis (Stanley, 2006).

Teniendo en cuenta que EhCPADH es una proteína heterodimérica (Garcia-Rivera, y col., 1999) que contiene una participación activa en los mecanismos de virulencia del protozooario *E. histolytica* y características inmunogénicas (Arroyo y Orozco, 1987; Martinez-Lopez, y col., 2004; Madriz-Garcia, y col., 2004) la hacen interesante como un posible candidato en el desarrollo de vacunas contra la amibiasis.

Dado que pueden existir regiones inmunoestimuladoras e inmunosupresoras en una misma proteína, es fundamental localizar aquellas regiones que solo confieran protección para ser utilizados como candidatos vacunales. Por lo que en este trabajo se planteo como objetivo buscar aquellos epítomos presentes en el complejo EhCPADH que tuvieran la capacidad de inducir una respuesta inmune celular del tipo Th1, reportada como la respuesta protectora contra el absceso hepático amibiano en modelos experimentales.

Análisis *in silico*

La identificación de los epítomos promiscuos, que se pueden unir al HLA, es indispensable para que una vacuna proteja al mayor número posible de individuos. Sin embargo, el desarrollo de las vacunas estaba afectado por el polimorfismo exhaustivo en el HLA (Gowthaman y Agrewala,

2007). No obstante las herramientas de la bioinformática como el programa ProPred, han sido ampliamente utilizadas para identificar péptidos promiscuos de unión a los HLA-DR, lo que ayuda a superar el obstáculo del polimorfismo del HLA (Mustafa, y col., 2007).

Los métodos convencionales para identificar epítomos promiscuos utilizan muchos péptidos sintéticos traslapados para un sólo antígeno, para posteriormente probar su inmunogenicidad. Estos métodos son difíciles de manejar y también son muy costosos, además de utilizar ensayos celulares complicados para la selección de epítomo. (Gowthaman y Agrewala, 2007)

En este trabajo de forma alternativa, se hizo uso de la bioinformática “análisis *in silico*” para predecir las regiones promiscuas “secuencias de péptidos” que mostraron un valor alto de unión a los 51 alelos del HLA que están incluidos en la base de datos del programa ProPred, con el uso de esta alternativa se tuvo un ahorro de tiempo en la selección de epítomos, en costos y en ensayos celulares.

En la identificación de epítomos en el complejo EhCPADH mediante el programa ProPred se evaluaron 5 epítomos de dos regiones promiscuas para la EhADH112 y 3 epítomos de tres regiones promiscuas de la EhCP112. Estos resultados *in silico* apoya la naturaleza inmunogénica de las proteínas EhADH112 y EhCP112, sugiriendo la probable presencia de epítomos T para su presentación antigénica a través de HLA-DR a las células-T.

Construcción de la cadena codificante de los poliepitomos EhADH y CP112

En ocasiones el uso de genes presentes en la naturaleza pudieran ser rápidamente utilizados para clonar y expresar, sin embargo muchos genes han demostrado poseer condiciones subóptimas para la clonación así como para la expresión en sistemas heterólogos como *E. coli* o levaduras. Un método para superar estas complicaciones en la clonación es la síntesis de genes, con este

método la secuencia codificante de la proteína de interés puede ser directamente optimizada para la expresión en cualquier sistema seleccionado (Dillon y Rosen, 1990).

El PCR de ensamblaje utilizado para la construcción de los genes sintéticos para los poliepítopos T identificados *in silico* presentes en las proteínas del complejo EhCPADH. Dicho método involucró la generación de oligonucleótidos traslapados que, cuando fueron ensamblados formaron la cadena codificante de los genes de los poliepítopos EhCPADH112 y EhCP112. Los genes sintéticos fueron amplificados utilizando una segunda reacción de PCR. Este método tiene un principio simple, sin embargo en la práctica presentó complicaciones como la falta de amplificación por polimerasas de alta fidelidad como la *Pfu*.

Así mismo se presentó la inserción de errores en la síntesis cuando se utilizó *Taq* polimerasa como en el caso específico del poliepítopo EhCP112, que a pesar de ser un fragmento pequeño (267 pb) se metieron dos mutaciones, una de ellas es una mutación silente que es la sustitución de una Guanina (G) por una Citosina (C), la segunda mutación es una mutación en la que el codón GGC que codifica para una Glicina fue sustituido por un codón GAC que codifica para un ácido aspártico. A pesar de dicha sustitución en el epítipo, éste seguía siendo reconocido por los mismos alelos, lo que no interfirió con la identificación de epítopos T.

La frecuencia de inserción de errores es en gran parte dependiente de la calidad de los oligonucleótidos, así como la fidelidad de la DNA polimerasa. Por otro lado se ha observado que cuando se lleva cabo una segunda reacción de PCR conlleva a la inserción de errores, por un lado por la baja fidelidad de la *taq* polimerasa, además si el producto de la PCR es el resultado de una amplificación inespecífica (www.medtrad.org/pana.htm).

Purificación de los poliepitopos recombinantes.

Para la expresión de los poliepitopos recombinantes se utilizaron cepas de *E. coli* BL21 pLysE ya que es un huésped atractivo para la producción de proteínas recombinantes por su relación costo-beneficio, por su idoneidad de fermentación a gran escala así como la abundancia de las proteínas recombinantes que llega ser hasta un 50% del total de proteínas (Lesley, 2001).

La expresión de los poliepitopos recombinantes generó la formación de cuerpos de inclusión y esto es debido a la limitada maquinaria de plegamiento en *E. coli* que provoca una limitada solubilidad de cualquier proteína sobre-expresada, por lo que es común la formación de estos agregados insolubles (Marston, 1986). Para prevenir la formación de cuerpos de inclusión de los poliepitopos recombinantes se usaron alternativas como la disminución de temperatura de inducción a 16°C y a 4°C disminución de la concentración de IPTG (0.5mM y 0.1mM) así como disminución de tiempo de inducción. Sin embargo con dichos cambios no se logró la prevención de dichos cuerpos de inclusión (Strandberg, y col., 1991).

Existen otras alternativas para la prevención de los cuerpos de inclusión como lo son: cambios en la composición del medio de fermentación, donde se adicionan azúcares no metabolizables o con el uso de medios mínimos esenciales (Georgiou, y col., 1986). Otra alternativa es la co-expresión en cepas que expresen chaperonas y foldeasas (Wall, y col., 1995).

El uso de cuerpos de inclusión como antígenos contra otros parásitos ha demostrado su inmunogenicidad (Rand, y col., 1989). Debe tomarse en cuenta que aunque es mayoritaria la proteína recombinante, se encuentran otras proteínas, así como la presencia de otras estructuras celulares como los lípidos y DNA los cuales pudieran interferir con la evaluación de la respuesta inmune (Mustafa, 1988).

Respuesta inmune humoral

Para evaluar la inmunogenicidad de los poliepítopos en el hamster se midieron las IgG totales, en hámsteres inmunizados con 120 µg de poliepítopos recombinantes por vía subcutánea como lo reportado por Martinez-Lopez, y col., 2004. Se observó que los títulos de anticuerpos IgG aumentaban en la medida en que los animales iban recibiendo las inmunizaciones.

El título de anticuerpos desarrollados a los 45 días por el poliepítopo EhCP112 fue menor que los títulos desarrollados por el poliepítopo EhADH112. Este fenómeno ha sido también observado cuando se inmuniza con los plásmidos *pcDNA-EhCP112* y *pcDNA-EhADH112* en el trabajo realizado por (Madriz-Garcia, y col., 2004)

Al evaluar los sueros de los hámsteres inmunizados con los poliepítopos recombinantes para cada uno de los epítopos sintéticos, se observó que el título de anticuerpos era menor en relación a la evacuación con los poliepítopos recombinantes. Además se pudo observar el desarrollo de una respuesta humoral cruzada contra los epítopos de la EhCP112 y la EhADH112.

Al realizar alineamientos múltiples de los epítopos de la EhCP112 y de la EhADH112 no se observó alineamiento entre ellos, sin embargo al hacer el alineamiento de los epítopos contra la etiqueta de GST, si se observó semejanza entre todos los epítopos evaluados con la etiqueta, lo que sugiere que la respuesta cruzada que se presentó es contra la etiqueta de GST.

Respuesta inmune celular.

Para los estudios de la respuesta celular se realizaron ensayos de linfoproliferación celular y estímulo con epítopos sintéticos para conocer el perfil de expresión de citocinas en esplenocitos de hámsteres inmunizados.

En los ensayos de linfoproliferación celular se encontraron mayores índices de estimulación celular, para los epítomos de la EhADH112 comparativamente a los epítomos de la EhCP112.

La presencia de una mayor respuesta celular para la EhADH112 ha sido también reportada en la inmunización de hámsteres con plásmidos *pcDNA-EhADH112* (Madriz-Garcia, y col., 2004)

Los 5 péptidos sintéticos (epítomos) evaluados de dos regiones promiscuas de la EhADH112 presentaron un 54.9% y 50.98% de unión a los HLA-DR predichos en el programa ProPred indujeron una respuesta celular del tipo Th1.

Por otro lado los 3 péptidos sintéticos (epítomos) evaluados de dos regiones de la EhCP112, presentaron 80% y 72% de unión a los HLA-DR Predichos en el programa ProPred indujeron una respuesta celular del tipo Th1. La correlación de la expresión de IFN- γ con porcentajes de unión mayores a un 50% a los HLA-DR de los epítomos T, ha sido demostrada en proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* tanto en líneas celulares de linfocitos T así como en sangre periférica de donadores. Donde se sugiere que la inducción de proliferación celular, así como la expresión de IFN- γ con el estímulo de epítomos T promiscuos se debe a una fuerte afinidad existente entre los alelos HLA y los epítomos (Mustafa, 2007).

Los hámsteres inmunizados con los poliepítomos EhCP112 presentaron índices de proliferación celular menores que hámsteres inmunizados con el polipéptido EhADH112, a pesar de tener porcentajes mayores de unión a los HLA-DR.

Esto puede deberse a que la mayoría de los programas para predecir péptidos de unión a los HLA de clase II, aún presentan un coeficiente de correlación de Matthew's (MCC) bajos. Dicho coeficiente evalúa la correlación entre la predicción y datos experimentales. Cabe destacar que el programa ProPred tiene un coeficiente de MCC máximo de 0.3 lo que indica que existe una exactitud del 70% (Gowthaman y Agrewala, 2007)

9. Conclusiones

- Se logró la construcción y la clonación de dos poliepítopos T del complejo EhCPADH112.
- No se pudo obtener una óptima purificación de los poliepítopos T recombinantes debido a la formación de cuerpos de inclusión.
- La respuesta humoral de los epítopos evaluados presentaron reacción cruzada con la etiqueta GST.
- Los 8 epítopos evaluados del complejo EhCPADH inducen proliferación celular.
- Los 8 epítopos evaluados del complejo EhCPADH112 de *Entamoeba histolytica* inducen una respuesta celular del tipo Th1.

10. Perspectivas

- Optimizar la purificación de los poliepítopos recombinantes.
- Evaluar la respuesta inmune celular de hámsteres inmunizados con los poliepítopos recombinantes puros.
- Evaluar la respuesta inmune celular del resto de los epítopos T clonados en los poliepítopos.
- Usar los epítopos evaluados en la presente investigación como estímulo de los esplenocitos de hámsteres inmunizados con las proteínas completas EhCP112 y EhADH112.
- Realizar patrón de citocinas en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con amibiasis.
- Realizar ensayos de protección con el poliepítopo EhCP112 y EhADH112
- Hacer curvas de dosis respuesta para los poliepítopos recombinantes.
- Realizar análisis de sobrevida.

11. Referencias bibliográficas.

- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T., 4ª Edición. McGRAW-Hill Interamericana., España., 2002:82-105
- Akira S, Yamamoto M, Takeda K. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signaling. *Biochem Soc Trans.* 31(3):637-642.
- Arroyo R, Orozco E. 1987. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol.* 23(2):151-8.
- Bansal D, Sehgal R, Charla Y, Malla N, Majan RC, 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian J. Med. Res.* 124(2):189-194.
- Borras-Cuesta F, Golvano J, Garcia-Granero M, Sarobe P, Riezu-Boj J, Huarte E, Lasarte J. 2000. Specific and general HLA-DR binding motifs: comparison of algorithms. *Hum. Immunol.* 61(3):266-278.
- Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA Jr. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 90(3):1131-1137.
- Brusic V, Rudy G, Honeyman G, Hammer J, Harrison L. 1998. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics.* 14(2):121-130.
- Brusic V, Bajic VB, Petrovsky N. 2004. Computational methods for prediction of T-cell epitopes-a framework for modelling, testing, and applications. *Methods.* 34(4):436-443.
- Brusic V, Rudy G, Harrison LC. 1998. MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997. *Nucleic Acids Res.* 26(1):368-371.
- Brusic V, Schonbach C, Takiguchi M, Ciesielski V, Harrison L C. 1997. Application of genetic search in derivation of matrix models of peptide binding to MHC molecules. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5:75-83.
- Brusic V, van Endert P, Zeleznikow J, Daniel S, Hammer J, Petrovsky N. 1999. A neural network model approach to the study of human TAP transporter. *In Silico. Biol.* 1(2):109-121.
- Calderon J, Schreiber RD, 1985. Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 50(2):560-565.
- Campbell D, 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(5):1176-83.
- Chadee K, Keller K, Forstner J, Innes DJ, Ravdin JI. 1991. Mucin and nonmucin secretagogue activity of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin in rat colon. *Gastroenterology.* 100(4):986-997.
- Chadee K, Petri WA Jr, Innes DJ, Ravdin JI. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 80(5):1245-1254
- Clark CG, Roger AJ. 1995. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(14):6518-6521.

- Denis M, Chadee K. 1988. In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun.* 56(12):3126-3131.
- Dillon PJ, Rosen CA. 1990 A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 9:, 298, 300.
- Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13(2):318-31.
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 351:290-296
- Flores-Romo L, Tsutsumi V, Estrada-Garcia T, Shibayama M, Aubry JP, Bacon KB, Martinez-Palomo A. 1994. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(1):116-117.
- Frederick JR, Petri WA Jr. 2005. Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology.* 15(12):53-59.
- Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Orozco E. 1999. *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol.* 33(3):556-68.
- Georgiou G; Telford JN, Shuler ML, Wilson DB. 1986. Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. *Appl Environ Microbiol* 52: 1157-61.
- Gimenez-Scherer JA, Cardenas G, Lopez-Osuna M, Velazquez JR, Rico G, Isibasi A, Maldonado Mdel C, Morales ME, Fernandez-Diez J, Kretschmer RR. 2004. Immunization with a tetramer derivative of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 26(8-9):343-9.
- Gowthaman U, Agrewala JN. 2007. *In silico* tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules: more confusion than conclusion. *J. Proteome. Res.* 7(1):153-164
- Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennish ML, Pickering LK. 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 32(3):331-351.
- Gutierrez-Kobeh L, Cabrera N, Perez-Montfort R. 1997. A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol.* 83(2):234-241.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA. 2003. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* 348:1565-1573.
- Ivory CP, Keller K, 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.* 2006 74:528-536.
- Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V. 2000. Morphological changes of mouse liver infected with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 31(4 Suppl):S251-253.

- Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. 2002. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Parasitol*. 101(1):40-56.
- Kammanadiminti SJ, Mann BJ, Dutil L, Chadee K. 2004. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *FASEB J*. 18(1):155-157.
- Kast WM, Brandt RM, Sidney J, Drijfhout JW, Kubo RT, Grey HM, Melief CJ, Sette A. 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J. Immunol*. 152:3904-3912.
- Kelsall BL, Ravdin JI. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*. 168(5):1319-1322.
- Krupp IM, Powell SJ. 1971. Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. *Am J Trop Med Hyg*. 20(3):421-424
- Lesley SA. 2001. High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Exp. Purif* 22:159-64.
- 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(5):1534-1541.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, 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, Rabinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillen 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.
- Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*. 75(4):693-708
- Madriz X, Martinez MB, Rodriguez MA, Sierra G, Martinez-Lopez C, Riveron AM, Flores L, Orozco E. 2004. Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology*. 150(5):1251-60.
- 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.
- Mamitsuka H. 1998. Predicting peptides that bind to MHC molecules using supervised learning of hidden Markov models. *Proteins*. 33(4):460-474.
- Mann BJ. 2002. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int Rev Cytol*. 216:59-80.

- Marinets A, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL, 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(9):1557-1565.
- Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J 1986. 240, 1-12.
- 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(4):367-376.
- Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitology Today 3(4):111-118.
- McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA Jr. 1994 Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. Infect Immun. 62(8):3045-3050.
- Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. J Immunol. 144(12):4803-4809.
- Morales-Espinoza EM, Sánchez-Pérez HJ, García-Gil MM, Vargas-Morales G, Méndez-Sánchez JD, Pérez-Ramírez M. 2003. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico Salud Publica Mex. 45:379-388.
- Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R, Enriquez-Rincon F. 1992. Kinetics of the anti-amebic antibody producing cells response in Peyer's patches and spleen after both local and systemic stimulation in Balb/c mice. 2:165-168.
- Mustafa AS. 1988. Identification of T-cell-activating recombinant antigens shared among three candidate antileprosy vaccines, killed *M. leprae*, *M. bovis* BCG, and Mycobacterium w. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 56(2):265-273.
- Mustafa AS; Shaban FA. 2006. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 86(2):115-124.
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J. Immunol. 152(1):163-175.
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annu Rev Microbiol. 56:39-64.
- Petri WA Jr, Ravdin JI. 1991. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 59(1):97-101.
- Petri WA Jr, Snodgrass TL, Jackson TF, Gathiram V, Simjee AE, Chadee K, Chapman MD. 1990. Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. J. Immunol. 144(12):4803-4809.
- Prilliman KR, Lindsey M, Jackson KW, Cole J, Bonner R, Hildebrand WH. 1998. Complexity among constituents of the HLA-B*1501 peptide motif. Immunogenetics. 48(2):89-97.

- Que X, Reed SL. 2000. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 13(2):196-206
- Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, Cobon GS. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:9657-9661.
- Ravdin JI., 1989. *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J Infect Dis.* 159(3):420-429.
- Ravdin JI., 1995. Amebiasis. *Clin Infect Dis.* 20(6):1453-1464.
- Ravdin, JI., 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8:247-260.
- Ravdin, JI., Jackson, T. F. H. G., Petri, W. A Jr., Murphy, C. F. M., Unger, B. L. P., Gathiriam, V., Skilogiannis, J. and Simjee, A. E. 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 162:768-772.
- Reed SL, Gigli I. 1990 Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J Clin Invest.* 86(6):1815-1822.
- Rico G, Diaz-Guerra O, Gimenez-Scherer JA, Kretschmer RR. 1992. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res.* 23(2):157-159.
- Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR. 2003. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res.* 90(4):264-7.
- Ruppert J, Kubo RT, Sidney J, Grey HM, Sette A. 1994. Class I MHC-peptide interaction: structural and functional aspects. *Behring Inst. Mitt.* 94:48-60.
- Salata RA, Cox JG, Ravdin JI. 1987. The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol.* 9(2):249-261.
- Salata RA, Martinez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Trevino N, Segovia E, Murphy CF, Ravdin JI. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* 136(7):2633-2639
- Sanchez-Guillen M, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Arguelles A, Ackers J, Shire A, Talamas-Rohana P. 2002. Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 66(6):731-737.
- Schafer JR, Jesdale BM, George JA, Kouttab NM, De Groot AS. 1998. Prediction of well-conserved HIV-1 ligands using a matrix-based algorithm, EpiMatrix. *Vaccine.* 16:1880-1884.
- Schonbach C, Miwa K, Ibe M, Shiga H, Nokihara K, Takiguchi M. 1996. Refined peptide HLA-B*3501 binding motif reveals differences in 9-mer to 11-mer peptide binding. *Immunogenetics.* 45(2):121-129

- Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. 1995 Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor-alpha production by macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 92(26):12175-12179.
- Seguin R, Mann BJ, Keller K, 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(7):2522-2527.
- Sepulveda B. 1982. Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev.Infect.Dis.* 4(6):1247-1253.
- Sette A, Buus S, Appella E, Smith JA, Chesnut R, Miles C, Colon SM, Grey HM. 1989. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86(9):3296-3300
- Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr. 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun.* 68(1):400-402.
- Seydel KB, Zhang T, Stanley SL Jr. 1997. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun.* 65(9):3951-3953.
- Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A. 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* 160(7):3363-3373.
- Stanley SL, Reed SL. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(6):G1049-54
- Stanley SL, Tian K, Koester JP, Li E. 1995. The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem.* 270(8):4121-4126.
- Stanley SL. 2003. Amoebiasis. *Lancet.* 361:1025-1034.
- Stanley SL. 2006. Vaccines for amoebiasis: barriers and opportunities. *Parasitology.* 133:S81-S86.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 368:215-221.
- Strandberg L, Enfors SO. 1991. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1669-74.
- Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.* 17:555-561.
- Talamas-Rohana P, Schlie-Guzman MA, Hernandez-Ramirez VI, Rosales-Encina JL. 1995 T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect Immun.* 63(10):3953-8.
- Tay J., Gutiérrez M., López R., Manjares ME., Molina J. *Entamoebosis o Amibiasis.* 7ª Edición., Méndez Editores., México D.F., 2003:63-79.

Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. J Infect Dis. 177(2):508-511.

Tsutsumi V, Martinez-Palomo A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. Am J Pathol. 130(1):112-119

Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am J Pathol. 117(1):81-91

Utrera-Barillas D, Velazquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico G, Curiel-Quesada E, Teran LM, Kretschmer RR. 2003. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. Parasite Immunol. 25(10):475-482.

Vercruysse J, Schetters TP, Knox DP, Willadsen P, Claerebout E. 2007. Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance?. Rev. Sci. Tech. 26(1):105-115.

Vohra H, Kaur U, Sharma AK, Bhalla V, Bhasin D. 2003. Effective human defense against *E. histolytica*: high amoebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. Parasitol Int. 52(3):193-202

Wall JG, Pluckthun A. 1995. Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 6:507-516.

Wang W, Keller K, Chadee K. 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. Immunology. 83(4):601-610.

WHO/PAHO/UNESCO. Report of a consultation of experts on amebiasis. México City, México, 1997. Pág. 1-3.

Zhang T, Cieslak PR, Foster L, Kunz-Jenkins C, Stanley SL Jr. 1994. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Parasite Immunol. 16(5):225-230.

Zhang T, Stanley SL Jr. 1994 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(6):2605-2608.