



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

***OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO POSIBLES
VACUNAS A PARTIR DE LA PROTEÍNA LC3 DE Entamoeba histolytica***

PRESENTA:

M. en C. Sandra Luz Martínez Hernández

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES:

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

COMITÉ TUTORAL

Dr. Daniel Cervantes García

Aguascalientes, Ags, Junio de 2017.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags a 6 de Junio, 2017

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas y presidente del
CONSEJO ACADEMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Presente:

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la aspirante a Doctor en Ciencias del doctorado en Ciencias Biológicas Sandra Luz Martínez Hernández, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado **"OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO POSIBLES VACUNAS A PARTIR DE LA PROTEÍNA LC3 DE *Entamoeba histolytica*"**, adicionalmente, los resultados de este proyecto se publicaron en la revista *Biotechnology Letters* con el artículo **"An anti-amoebic vaccine: generation of the recombinant antigen LC3 from *Entamoeba histolytica* linked to mutated exotoxin A (PEDIII) via the *Pichia pastoris* system"**, por lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma, por lo que damos nuestro voto aprobatorio para que continúe con los trámites para presenta el examen de grado reglamentario.

Atte:

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

TUTORES

Dr. Daniel Cervantes García
Miembro del Comité Tutorial



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

SANDRA LUZ MARTINEZ HERNANDEZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“OBTENCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES COMO POSIBLES VACUNAS A PARTIR DE LA PROTEINA LC3 DE *Entamoeba histolytica*”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

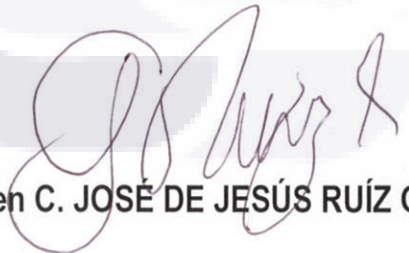
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 08 de junio de 2017

“Se lumen proferre”

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



Este trabajo de investigación ha sido financiado por:

CONACYT Ciencia Básica: 134487

Proyecto Interno PIBB11-3

Le agradezco al CONACYT por la beca financiada (244835) como parte del programa de doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes

Agradecimientos

Dr. Javier Ventura Juárez por ayudarme, enseñarme y apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones.

Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por la confianza y el conocimiento brindado.

Dr. Daniel Cervantes, muchas gracias por enseñarme un poco de lo mucho que sabes, por la dedicación, tú amistades y espero que sigamos trabajando juntos.

Dra. María de Jesús Loera Arias y Dr. Ángel Isidro Ascacio Martínez por su apoyo y amistad.

Dr. Martín Muñoz por ser un gran amigo y consejero.

Dra. Liseth Aldaba y a la M en C. Julieta Pulido por ser grandes personas, investigadoras y mis grandes amigas.

L.A.Q.B Adriana Cuellar, L.A.Q.B Rosario Lomeli, por escucharme, apoyarme y brindarme todo lo que me hiciera falta y por su amistad.

Dr. Juan Jáuregui y al Ingeniero Miguel Ángel Marín.

A mis niñas: Viridiana Becerra y Jessica Esparza.

Además quiero agradecer a todas estas personas que me hicieron simplemente más ligero

el camino: Dr. Chelito, Biol. Araceli Adabache, M en C. Fabiola Villalobos,

Dra. Esperanza Sánchez, Dr. Manuel Ávila, Nathali López, Andrea Guillen, Sofía, Jaime,

Anahí, Haró, Stephen, Montse y Daphne.

A las Chicas del Doctorado

Dra. Fabiola, Dra. Alma, Dra. Adriana, Dra. Julieta, Dra. Karina, Dra. María: recuerden que no necesitamos tener títulos para tener un gran conocimiento ni ser mejores personas.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico con todo mi amor a:

Mi esposo Víctor Loera por ser mi compañero de vida, por caminar a mi lado, por aguantarme y simplemente por quererme incondicionalmente.

A mi hermosa hija, eres el mejor resultado que obtuve, eres mi pedacito de cielo mi pedacito de LUNA (TE AMO)

A mis padres: Sandra y Gildo

A mis hermanos: Abraham y Denisse

A mi segunda familia: Lourdes y Víctor

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	9
Abstract	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	11
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>: características generales	11
1.1.1 Epidemiología	11
1.1.2 Ciclo de vida	11
1.1.3 Estructura celular	13
1.2 Desarrollo de la enfermedad	14
1.2.1 Patogénesis	14
1.2.2 Factores de virulencia	14
1.2.3 Mecanismos moleculares de la patogénesis	17
1.2.4 Respuesta inmune del hospedero	22
1.2.5 Respuesta inmune celular	23
1.2.6 Respuesta inmune humoral	26
1.3 Tratamientos contra la amibiasis	27
1.4 Vacunas	29
1.4.1 Generalidades de las vacunas	29
1.4.2 Clasificación de las vacunas	30
1.4.2.1 Vacunas convencionales	30
1.4.2.2 Vacunas de nueva Generación.	31
1.4.3 Mecanismos inmunológicos de las vacunas	33
1.4.3.1 Inmunología de las vacunas de mucosas	33
1.4.3.1.1 Anticuerpos secretores en mucosas	34
1.4.3.1.2 Inmunidad mediada por células en mucosas	35
1.4.3.2 Inmunología de las vacunas en la piel	37

1.5 Vacunas contra agentes infecciosos	39
1.5.1 Vacunas contra parásitos	39
1.5.2 Vacunas contra <i>Entamoeba histolytica</i>	40
1.5.2.1 Proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas contra <i>Entamoeba histolytica</i> .	41
1.6 Estrategias para el desarrollo de vacunas	43
1.7 Sistemas de expresión	45
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN	47
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS	48
CAPÍTULO IV: OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo General	49
4.2 Objetivos específicos	49
CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1 Estrategia general	50
5.1.1 Diseño del gen de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3	51
5.2 Construcción del vector de expresión pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3	52
5.2.1 Digestión enzimática del pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3	53
5.2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	53
5.2.3 Purificación de fragmentos de ADN	53
5.2.4 Ligación del fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3 en pPIC9	54
5.2.5 Transformación bacteriana por choque térmico	54
5.2.6 Extracción de DNA plasmídico	55
5.2.7 PCR para la caracterización de PE Δ III-LC3-KDEL3	55
5.2.8 Caracterización por digestión enzimática de PE Δ III-LC3-KDEL3	56
5.2.9 Secuenciación de los genes de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3	56
5.3 Transformación de <i>Pichia pastoris</i> -GS115	56

5.3.1 Transformación de levaduras por electroporación	56
5.3.2 Extracción de ADN total	57
5.3.3 PCR para el análisis de integración de PE Δ III-LC3-KDEL3 al genoma de <i>P. pastoris</i>	57
5.4 Ensayos de expresión y purificación de PEΔIII-LC3-KDEL3 en <i>P. pastoris</i>	58
5.4.1 Inducción a nivel matraz	58
5.4.2 Análisis de proteínas en medio de cultivo (nivel matraz)	59
5.4.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	59
5.4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes	59
5.4.2.2.1 Tinción de geles de poliacrilamida	59
5.4.2.2.1.1 Tinción con Nitrato de plata	59
5.4.2.3 Identificación de proteínas por Dot-blot	60
5.5 Escalamiento de PE Δ III-LC3-KDEL3 en biorreactor de tanque agitado.	60
5.5.1 Análisis de proteínas en medio de cultivo a partir del escalamiento en biorreactor	61
5.5.1.2 Diálisis de proteínas	61
5.5.1.3 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad	62
5.5.1.4 Identificación de glicosilaciones en PE Δ III-LC3-KDEL3	62
5.5.1.4.1 Tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff)	62
5.5.1.5 Inmunodetección de proteínas: Western-blot para PE Δ III-LC3-KDEL3	63
5.5.1.5.1 Electroforesis	63
5.5.1.5.2 Transferencia	63
5.5.1.5.3 Inmunodetección	63
5.6 Ensayos de actividad biológica	64
5.6.1 Animales de experimentación	64
5.6.2 Ensayos de inmunización	64

5.6.3 Detección de anticuerpos específicos contra PE Δ III-LC3-KDEL3 por ELISA	65
5.7 Análisis estadístico	66
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	67
6.1.1 Diseño del antígeno recombinante de fusión PEΔIII-LC3-KDEL3	67
6.1.2 Clonación de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el vector pPIC9	68
6.1.3 Amplificación por PCR del gen de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3 en pPIC9	69
6.1.4 Comprobación de la integridad de PE Δ III-LC3-KDEL3 por secuenciación	71
6.2 Integración de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el genoma de <i>P. pastoris</i>	72
6.3 Expresión, purificación, y caracterización del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3	72
6.3.1 Producción a nivel matraz	72
6.3.1.1 Detección del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 por Dot-blot	73
6.3.2 Producción del antígeno recombinante en biorreactor	75
6.3.2.1 Detección del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3	76
6.3.2.2 Identificación de glicosilaciones en el antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3	78
6.3.2.3 Inmunodetección del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 mediante Western-blot	80
6.4 Bioensayo para determinar actividad biológica del antígeno PEΔIII-LC3-KDEL3	81
6.4.1 Producción de anticuerpos específicos frente al antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3	81
CAPÍTULO VII: DISCUSIONES	83
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO IX: GLOSARIO	90

CAPÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA	91
11. ANEXOS	118
12. PRODUCTOS OBTENIDOS	



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Antígenos de <i>E. histolytica</i> probados en animales de experimentación	43
Tabla 2.	Reacción utilizada para la clonación de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el vector pPIC9	54
Tabla 3.	Oligonucleótidos específicos para el fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3	55
Tabla 4.	Condiciones establecidas durante la fermentación. Temp: temperatura, TFerm: tiempo de fermentación, TFin: tiempo final de fermentación	61
Tabla 5.	Anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas	64
Tabla 6.	Tratamiento	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de Vida	12
Figura 2.	Estructura de la Gal-GalNac	15
Figura 3.	Formación de úlceras y proceso de migración mediados por el parásito	20
Figura 4.	Formación del absceso hepático amibiano en hámster	21
Figura 5.	Respuesta inmune durante la infección	25
Figura 6.	Forma de activación del metronidazol y su mecanismo de acción en <i>E. histolytica</i>	28
Figura 7.	Estrategia general sobre el diseño, producción y evaluación del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3	50
Figura 8.	Diseño de la proteína de fusión con el fragmento LC3 de <i>Entamoeba histolytica</i>	51
Figura 9.	Vector de expresión pPIC9 para <i>Pichia pastoris</i>	52
Figura 10.	Esquema de inmunización	65
Figura 11.	Diseño de la proteína recombinante de fusión PE Δ III-LC3-KDEL3	67
Figura 12.	Digestión enzimática de PE Δ III-LC3-KDEL3 y linealización de pPIC9	68
Figura 13.	Construcción del vector pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3	69

Figura 14.	Caracterización por PCR de la construcción pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3	70
Figura 15.	Caracterización enzimática de pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3	70
Figura 16.	Secuenciación de PE Δ III-LC3-KDEL3	71
Figura 17.	Análisis integración genómica de pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 en <i>P. pastoris</i>	72
Figura 18.	Ensayos de expresión a nivel matraz de clones recombinantes GS115-PE Δ III-LC3-KDEL3	73
Figura 19.	Identificación de PE Δ III-LC3-KDEL3 recombinante mediante Dot-blot	74
Figura 20.	Consumo de glicerol y crecimiento de biomasa obtenido durante la fermentación	76
Figura 21.	Producción de proteínas durante la fermentación	77
Figura 22.	Fase de inducción: proteínas totales y biomasa	77
Figura 23.	Gráfico de los parámetros establecidos durante la fase de inducción	78
Figura 24.	Análisis de la proteína recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 mediante electroforesis (SDS-PAGE)	79
Figura 25.	Western-blot para la identificación del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3	80
Figura 26.	PE Δ III-LC3-KDEL3 induce la producción de anticuerpos IgG	82

RESUMEN

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un protozoo parásito causante de la disentería y absceso hepático amibiano. Se estima que aproximadamente 50 millones de personas a nivel mundial se encuentran infectadas, la infección por este parásito deja entre 50,000 a 100,000 muertes por año. La lectina Gal-GalNAc es una proteína ampliamente caracterizada, su función está asociada al reconocimiento, unión y muerte de las células del huésped. A partir del amplio conocimiento que se tiene de la función y estructura de la GalNAc, se planteó generar una proteína recombinante de fusión utilizando una porción rica en cisteína denominada LC3, esto con el objetivo de producir una vacuna contra este patógeno. Para esta finalidad se diseñó un gen sintético el cual codifica para el fragmento LC3 de *E. histolytica* fusionado a la secuencia del gen de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE), con delección en el dominio III (PE Δ III) y a su vez a la secuencia KDEL3 con optimización de codones para la expresión en *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). El transgen PE Δ III-LC3-KDEL3 fue subclonado en el plásmido pPIC9 para la expresión inducible con metanol. Utilizando la técnica de PCR y el análisis de restricción enzimática identificamos y seleccionamos clonas transformadas positivamente con el plásmido pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. La integración del vector en el genoma de la levadura se analizó por PCR. Una vez caracterizada la integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura, se realizaron ensayos de expresión y producción de la proteína y mediante SDS-PAGE y Western-blot se pudo identificar una proteína glicosilada de aproximadamente 67 kDa en fracciones purificadas. El anticuerpo anti-6X His tag mostró una alta especificidad de reacción la cual fue consistente con la reactividad mostrada por el anticuerpo anti-*E. histolytica* permitiéndonos confirmar la presencia de la proteína PE Δ III-LC3-KDEL3. El escalamiento de la proteína se realizó en un biorreactor de tanque agitado en condiciones controladas, donde el producto (3.8 g/L) obtenido fue purificado y evaluado. Para probar la capacidad de PE Δ III-LC3-KDEL3 de inducir una respuesta inmune, se llevó a cabo inmunización en hámsteres (*Mesocricetus auratus*) utilizando diferentes dosis del antígeno recombinante, y a través de ELISA se hizo la detección de IgG total. Los resultados obtenidos muestran niveles significativos de IgG lo cual nos sugiere que el antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 tiene aplicaciones potenciales como un inmunógeno para la vacunación contra *E. histolytica*.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) is a protozoan parasite of dysentery and amebic liver abscess. It is estimated that approximately 50 million people worldwide are infected, of which occur between 50,000 and 100,000 deaths per year. Gal-GalNac lectin is a widely characterized protein, it associated with recognition, binding and death of host cells. From the extensive knowledge of the function and structure of Gal-GalNac, it was proposed to generate a recombinant fusion protein using a cysteine rich portion LC3. The aim of generate this recombinant protein is to be used as a vaccine against this pathogen. For this purpose, a synthetic gene was designed which encodes the *E. histolytica* LC3 fragment fused to the *Pseudomonas aeruginosa* (PE) exotoxin A gene sequence deletion in domain III (PE Δ III), also the KDEL3 sequence was included, the whole synthetic gene was codon optimization for expression in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). The PE Δ III-LC3-KDEL3 transgene, was subcloned into the plasmid pPIC9 for it expression inducible with methanol. By PCR and the enzymatic restriction analysis, integration of the vector into the yeast genome was analyzed. Once the transformed clones were characterized to test the vector integration, protein expression and purification assays were performed. With SDS-PAGE and Western blot analyzes a glycosylated protein of approximately 67 kDa could be identified in purified fractions. The anti-6X His antibody showed a high specificity of reaction, which was consistent with the reactivity shown by the antibody anti-*E. histolytica*, it allowed to confirm the presence of the protein PE Δ III-LC3-KDEL3.

The production was performed in a stirred tank bioreactor under controlled conditions, where the product obtained was purified and evaluated. To test the immunogenic capacity of PE Δ III-LC3-KDEL3, an immunization protocol was established in hamsters (*Mesocricetus auratus*) at different doses of the recombinant antigen, the detection of total IgG was performed by ELISA. The obtained results show significant increased IgG levels, this result suggest that the PE Δ III-LC3-KDEL3 antigen has potential applications as an immunogen for vaccination against *E. histolytica*.



CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Entamoeba histolytica*: características generales

1.1.1 Epidemiología

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un protozoo parásito causante de la disentería y absceso hepático amibiano. Se estima que aproximadamente entre 35 a 50 millones de personas se encuentran infectadas, las cuales pueden desarrollar colitis amibiana o complicaciones extraintestinales lo que deja como resultado de 50,000 a 100,000 muertes por año (WHO, 1997). La enfermedad es mucho más frecuente en países en desarrollo debido al mal saneamiento, la falta de agua potable y la desnutrición (Mondal *et al.*, 2009). En regiones como Bangladesh (Haque *et al.*, 2001), Sudáfrica (Ravdin *et al.*, 2003; Abd-Alla *et al.*, 2006) y Vietnam (Blessmann *et al.*, 2002), este agente es uno de los responsables de las enfermedades diarreicas, donde la incidencia puede llegar hasta en un 40% (Haque *et al.*, 2001). Los niños son los más susceptibles a la enfermedad y debido a ello la amibiasis es su principal causa de mortalidad (Hien *et al.*, 2007). Alrededor del 90% de las infecciones son asintomáticas y el 10% restante presenta un espectro de enfermedades que incluyen diarrea aguda, disentería, colitis amebiana y abscesos hepáticos amibianos (AHA) (Haque *et al.*, 2003).

En México la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública, en el 2006 se estimó una tasa de morbilidad de entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes (Ximénez *et al.*, 2007). La seroprevalencia varía en las zonas geográficas, donde, estados ubicados al sur del país presentan valores más altos (9%). En el Noreste y Golfo de México presentan los valores más bajos (Caballero *et al.*, 1996; Ximénez *et al.*, 2007).

1.1.2 Ciclo de Vida

La infección por *E. histolytica* suele producirse por la ingestión de los quistes (Martínez-Palomo 1989; Samuelson *et al.*, 2013), los cuales, particularmente en las regiones endémicas, pueden encontrarse en diversos materiales o en superficies como agua, alimentos y objetos que han sido contaminadas con materia fecal (Mi-ichi *et al.*, 2016). El

quiste mide de 10 - 16 μm de diámetro, y está cubierto por un polímero de n-acetilglucosamina (Martínez-Palomo, 1989; Gómez *et al.*, 2007), la cual le permite pasar a través de las estrictas condiciones ácidas del estómago y duodeno y llegar al intestino delgado, donde eclosionan y se convierten en trofozoítos proliferativos.

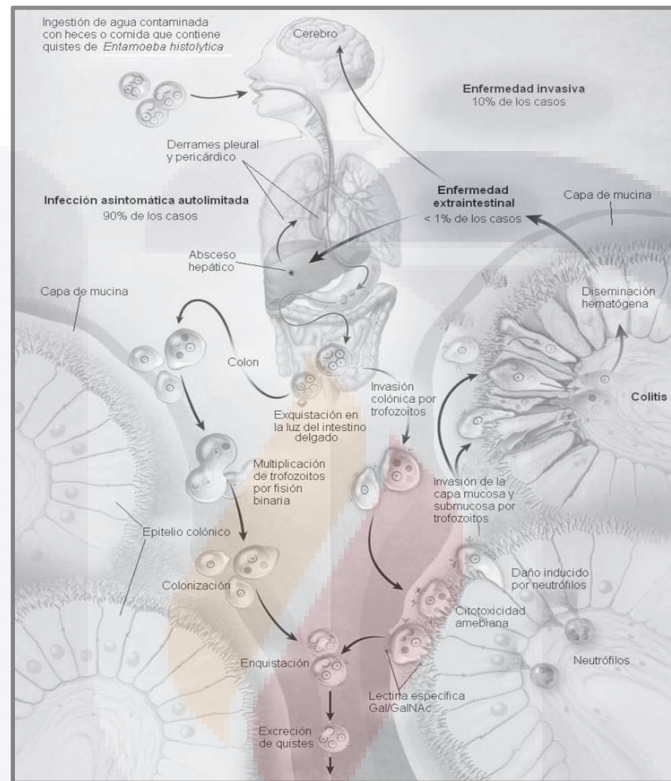


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección se da a través de la ingesta de quistes generalmente por comida o agua contaminada con materia fecal. La exquistación ocurre en el íleon del intestino delgado, los trofozoítos se multiplican por fisión binaria en el intestino grueso donde permanecen para llevar a cabo la invasión en el tejido. Los trofozoítos que no llevan a cabo la invasión se convierten en quistes que son liberados en las heces fecales (Modificado de Gómez *et al.*, 2007)

El trofozoíto (10 a 14 μm de diámetro) se mueve pasivamente y coloniza el intestino grueso, el cual en alguno de los casos experimenta progresión a pasos invasivos que están estrechamente asociados con las manifestaciones clínicas y la patogénesis de la amibiasis (Moonah *et al.*, 2013; Begum *et al.*, 2015). Mientras tanto, algunos trofozoítos proliferantes se diferencian en quistes. Los quistes recién formados, son entonces excretados durante

los movimientos intestinales y liberados a través de la materia fecal. Por lo tanto, los quistes son los únicos responsables de la transmisión de la enfermedad y su eliminación puede detener la propagación de esta enfermedad infecciosa a otros individuos (Mi-ichi *et al.*, 2016) (Figura 1).

1.1.3 Estructura Celular

Los trofozoítos de *E. histolytica* presentan una membrana celular que está situada por debajo del glucocáliz (estructura rica en carbohidratos) (Silva *et al.*, 1975). Constituida por tres capas, dos más delgadas, osmiofílicas y electrodensas de 35-40 Å de espesor y una capa media electro-transparente más amplia de 45-50 Å de espesor. Por debajo de esta hay presencia de gránulos subpediculares oscuros. El citoplasma o también llamado endoplasma, contiene un gran número de polisomas y ribosomas los cuales pueden dar la apariencia de grandes cuerpos helicoidales de 0.3 a 1 µm de espesor, se observa además, la presencia de partículas osmiofílicas abundantes y dispersas, abundantes vacuolas de distintos tamaños (Ludvik y Shipstone, 1970). El citoesqueleto está conformado principalmente por actina dispersa en el citoplasma, la cual durante los procesos de motilidad se puede agrupar en los sitios de formación de pseudópodos. Carece de organelos como mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas y retículo endoplásmico (Meza *et al.*, 1994). En su lugar se ha observado la presencia de Mitosomas (León-Avila y Tovar, 2004) o criptón (Ghosh *et al.*, 2000) los cuales presentan algunos complejos enzimáticos hierro-azufre, vacuolas pequeñas parecidas a lisosomas (que permiten la degradación de partículas) y una estructura tubular larga y delgada parecida a un retículo endoplásmico (ensamblaje de proteínas) (Meza *et al.*, 1994). El núcleo está rodeado por una doble membrana con numerosos poros (envoltura nuclear), presenta un nucleoplasma muy electrodenso. La cromatina se dispone en la periferia del núcleo por debajo de la envoltura nuclear. Presenta un cariosoma de forma irregular situado en la parte central del núcleo, al cual se le puede observar pequeños cuerpos oscuros (Ludvik y shipstone, 1970). El genoma está constituido por 20,799,072 pares de bases (pb), presenta 8,201 genes predichos (Lorenzi *et al.*, 2010), algunos autores reportan una gran variedad de adaptaciones metabólicas compartidas con otros microorganismos como *Giardia lamblia* (Baum *et al.*, 1989) y *Trichomonas vaginalis* (Loftus *et al.*, 2005), las cuales incluyen reducción o eliminación de la mayoría de las vías metabólicas mitocondriales (Jordan *et al.*,

2003), además la presencia de enzimas relacionadas a estrés oxidativo, genes asociados a factores de virulencias y genes que codifican para receptores asociados a quinasas (Loftus *et al.*, 2005).

El quiste posee una pared lisa y rígida, dependiendo de maduración se pueden observar de 1 a 2 núcleos, cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno, cuando éste madura se pueden observar 4 núcleos, los cuerpos cromáticos desaparecen (Mi-ichi *et al.*, 2016).

1.2 Desarrollo de la enfermedad

1.2.1 Patogénesis

La infección por *E. histolytica* tiene un resultado variable debido al tipo de manifestación clínica que se presente, sin embargo cuando ocurre la enfermedad invasiva, la potente actividad citotóxica del parásito contribuye en gran parte al desarrollo de la enfermedad. El daño extenso en los tejidos es debido a los factores implicados en la muerte de las células en cuestión de minutos (Radvin *et al.*, 1980), aunado a ello las implicaciones de las reacciones inflamatorias (Helk *et al.*, 2013).

La colonización, la degradación de la mucina, la muerte de las células seguido por la invasión y diseminación a órganos blancos son los eventos centrales en la patogénesis de la infección (Ralston y Petri, 2011).

1.2.2 Factores de virulencia

La virulencia de *E. histolytica* es muy compleja e intervienen factores relacionados con el huésped, el microambiente y el parásito (Cook, 1990). La habilidad del trofozoíto para destruir el tejido del huésped y sobrevivir es acompañada por una fuerte respuesta inmune, la cual requiere de la regulación de diversas proteínas amibianas (Bruchhaus, 2002). Los factores de virulencia que más se han estudiado en *E. histolytica* son cuatro: las moléculas de adhesión, especialmente la lectina Gal-GalNac (Gilchrist y Petri, 1999), las cisteín proteinasas (Que, 2000; Bruchhaus *et al.*, 2003), la proteína amebaporo (Leippe 1997; Leippe *et al.*, 2005) y las moléculas de lipofosfopeptidoglicano (Vicanco-Cid *et al.*, 2007).

-La Gal-GalNac (260 kDa) es una de las moléculas mejor estudiadas. Es una adhesina con especificidad para los residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina (McCoy *et al.*, 1994; Petri *et al.*, 2002). Es una proteína de superficie celular que media la adhesión del parásito a la mucosa colónica humana, las células epiteliales del colon, y otras células diana (Radvin y Guerrant, 1981). La Gal-GalNac está compuesta por una subunidad pesada de 170 kDa (HgL) unida por puentes disulfuro y una subunidad ligera de 31/35 kDa (LgI), asociada de manera no covalente con una subunidad intermedia (Igl) de 150 kDa (Petri *et al.*, 2002). La secuencia de aminoácidos de HgL consiste de un dominio extracelular dividido en tres regiones dependiendo de su composición y un dominio citoplásmico carboxi-terminal formado por 41 aminoácidos (Mann *et al.*, 1991; Mann y Lockhart., 1998; Petri *et al.*, 1989; Quach *et al.*, 2016).

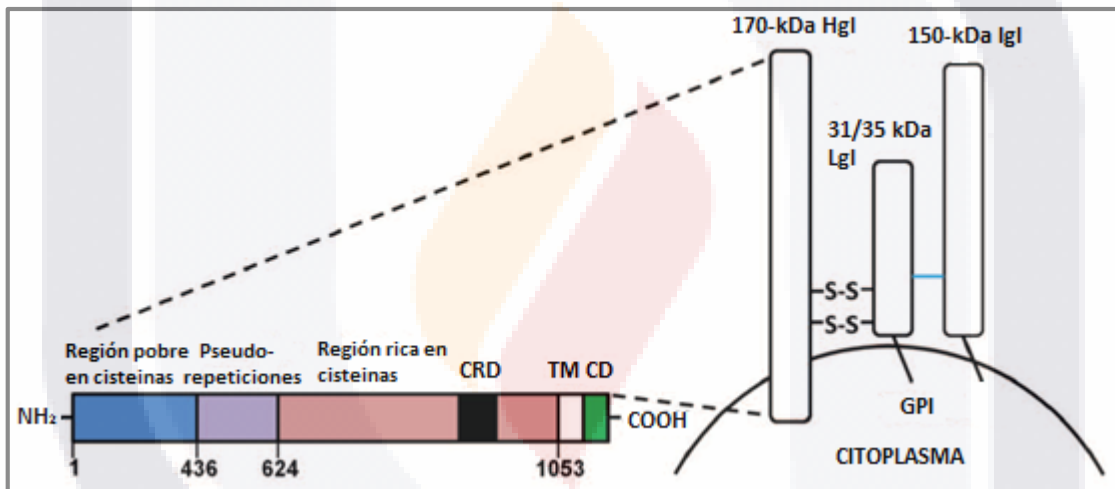


Figura 2. Estructura de la Gal-GalNac. La Gal-GalNac está compuesta por 3 subunidades: la subunidad pesada (Hgl), la subunidad ligera (Lgl) y una subunidad intermedia (Igl). La subunidad pesada está unida por puentes disulfuro a la subunidad ligera y ésta asociada de manera no covalente a la subunidad intermedia, además esta presenta una cola citoplasmática corta. La subunidad ligera e intermedia están ancladas a la membrana a través del Glicosilfosfatidilinositol (GPI). TM, transmembrana; CD, dominio citoplasmático; CRD, dominio rico en carbohidratos (modificado de Quach *et al.*, 2016).

Contiene una porción rica en cisteínas (CRD) la cual muestra una homología con CD59, un complejo inhibidor del complemento presente en el humano (Ventura-Juárez *et al.*, 2009) además presenta homología con la β 2-integrina (Petri *et al.*, 2002). La subunidad intermedia

(150 kDa) presenta porciones ricas en cisteínas, carece de dominios de reconocimiento a carbohidratos, se encuentra anclada a la membrana a través del glicosilfosfatidilinositol, es parte del complejo multimolecular de la Gal-GalNac del parásito la cual es necesaria para la interacción del huésped (Cheng *et al.*, 2001) (Figura 2).

-*Amebaporos*: son proteínas ubicadas dentro de vesículas citoplasmáticas, formadas por 4 hélices alfa, con 3 isoformas denominadas A, B y C. La isoforma C es la más activa, produciendo estructuras tipo canal que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas provocando cambios osmóticos a nivel de membrana celular de las células del huésped (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Ralston y Petri, 2011). Su dimerización es dependiente de pH (Hecht *et al.*, 2004). En estudios *in vitro* se ha demostrado su capacidad citolítica sobre líneas celulares de leucemia (HL-60 y Jurkat) y sobre polimorfonucleares además su función está implicada en la inducción de la apoptosis (Andra *et al.*, 2003).

-*Cisteín-proteasas (EhCP)*: son enzimas con capacidad para digerir constituyentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV (Gómez *et al.*, 2007). Existen al menos 50 cisteín-proteasas, sin embargo, sólo la *EhCP2*, *EhCP1* y *EhCP5* son responsables de aproximadamente el 90% de la actividad proteasa de este parásito, donde la de mayor importancia es la *EhCP5* (Casados-Vázquez *et al.*, 2010). En general estas enzimas, 1) rompen la capa de mucina en su dominio carboxiterminal, 2) degradan directamente la IgA y realizan disrupción de IgG, 3) confieren resistencia a la lisis mediada por el complemento, interrumpiendo la amplificación de la respuesta inmune a través de la degradación de las anafilotoxinas C3a y C5a (Que *et al.*, 2003).

-*Lipofosfogluconos y lipopeptidofosfogluconos*: son un complejo de macromoléculas encontradas en la superficie de los trofozoítos, tienen la capacidad de interactuar con células dendríticas (DC) y macrófagos permitiendo activar la respuesta inmune del huésped (Vivanco-Cid *et al.*, 2007).

1.2.3 Mecanismos moleculares de la patogénesis

El primer paso en el desarrollo de la patogénesis implica la unión de los trofozoítos a las células epiteliales intestinales (CEI), sin embargo, durante etapas tempranas éste proceso no es claramente visible ya que la disrupción del tejido no se presenta. Por otro lado la inflamación y el flujo de neutrófilos por debajo del epitelio y aumento de la proliferación de linfocitos es un evento claramente marcado (Prathap y Gilman, 1970), debido a que las moléculas secretadas por el parásito que transitan en el epitelio son las que desencadenan éste efecto.

El acoplamiento de las moléculas del parásito a receptores de reconocimiento de patrón (RRP) encontrados en las células inmunes permiten el inicio de la interacción celular con *E. histolytica*. Las señales binarias producidas por la señalización RRP identifican la naturaleza del antígeno y son un requisito previo para las respuestas inflamatorias (Mortimer y Chadee, 2010). El parásito expresa una gran cantidad de moléculas en su membrana, una de ellas, el lipopeptidofosfoglucono (LPPG) (Maldonado-Bernal *et al.*, 2005; Lotter *et al.*, 2009) se encarga de mediar la activación de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4 con la consecuente activación del factor nuclear kappa de las células B (NF- κ B) promoviendo así la inflamación (Maldonado-Bernal *et al.*, 2005).

Los efectos de LPPG en el epitelio intestinal no se han investigado ampliamente. Sin embargo, se sabe que ésta molécula junto con las prostaglandinas E2 (PGE2) (Dey *et al.*, 2003) generan una disrupción de las uniones estrechas de las CEI, permitiendo con ello la transferencia del LPPG a la superficie baso lateral (Lauwaet *et al.*, 2004), lo que provoca la entrada de estas moléculas al medio interno del intestino desencadenando los primeros eventos de inflamación. Por otro lado la Gal-GalNac, otra proteína importante del parásito la cual se une con alta afinidad a residuos de galactosa y N-acetil galactosamina (Moncada *et al.*, 2005) es también transferida a través de la capa epitelial (Leroy *et al.*, 1995; Lauwaet *et al.*, 2004). Ésta se encarga de promover la apoptosis dependiente del contacto, ya que puede estar relacionada al aumento de calcio (Ca^{2+}) intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación del ADN, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y activación de caspasa-3 en las células del huésped lo que promueve la muerte celular (Ragland *et al.*, 1994; Radvin *et al.*,

1988; Huston *et al.*, 2003; Ralston y Petri 2011). Junto con estos eventos, *E. histolytica* también va secretando altos niveles de cisteín proteasas como la *EhCP5*, la cual escinde el extremo C-terminal del polímero MUC2, consiguiendo con ello la degradación del moco (Lidell *et al.*, 2006), además se ha observado que durante este evento ocurre también la degradación de la inmunoglobulina A (IgA) (Kelsall y Ravdin, 1993; García-Nieto *et al.*, 2008) ya sea IgA1 e IgA2 (García-Nieto *et al.*, 2008; Macpherson *et al.*, 20089) y la inactivación de la inmunoglobulina G (IgG) circulante (Tran *et al.*, 1998).

Las hidrolasas por su parte están también implicadas en la disrupción del tejido intestinal (Reed *et al.*, 1995; Bansal *et al.*, 2009; Thibeaux *et al.*, 2013; Thibeaux *et al.*, 2014) presentan diferentes funciones, sin embargo, las de mayor importancia para la degradación de carbohidratos son la β -N-acetil-D-glucosaminidasas (Moncada *et al.*, 2005).

La inflamación es una espada de doble filo. Por un lado, protege al huésped contra patógenos invasivos, mientras que por el otro puede conducir a daños graves en los tejidos. En el contexto de infecciones intestinales invasivas, se cree que la respuesta inflamatoria inicial a *E. histolytica* agrava y posiblemente conduce a la patogénesis.

Los estudios histológicos indican que los trofozoítos cuando liberan todo el complejo de moléculas implicadas en la invasión entran en la lámina propia a través de micro-erosiones en el epitelio (Prathap y Gilman, 1970; Chadee y Meerovitch, 1985), lo cual le permite al parásito entrar en el tejido pasivamente. Los modelos *in vivo* corroboran esta teoría. En un modelo de xenoinjerto intestinal de ratón-humano, la infección del xenoinjerto con trofozoítos desencadena una respuesta inflamatoria aguda en el tejido injertado caracterizada por una fuerte expresión de interleucina 1 β (IL-1), interleucina 8 (IL-8) y un influjo abundante de neutrófilos (Seydel *et al.*, 1997). Cuando se bloquea la expresión génica impulsada por la activación del NF- κ B se evita el daño al xenoinjerto intestinal, se mantiene la integridad de la barrera epitelial y se atenúa el flujo de neutrófilos (Seydel *et al.*, 1998).

Aunque la mayoría de las invasiones intestinales se resuelven después de una respuesta inflamatoria aguda, algunos trofozoítos son capaces de escapar a su eliminación por parte del sistema inmune en algunos individuos y éstos desarrollan lesiones intestinales (Prathap

y Gilman, 1970). Antes de que los trofozoítos se trasladen a la zona subepitelial, se producen pequeñas erosiones focales en la mucosa (Espinosa-Cantellanos y Martínez-Palomo, 2000). La lámina propia está infiltrada no sólo con neutrófilos, sino también con macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y eosinófilos, y existe la proliferación continua de células dentro de folículos linfoides cercanos (Prathap y Gilman, 1970).

Los trofozoítos se vuelven abundantes en los sitios de disrupción epitelial y se absorben en un exudado purulento espeso. En las lesiones avanzadas se forman úlceras (nodulares e irregulares), donde los bordes socavan la mucosa y se extienden hacia las capas musculares y serosas. Los bordes de las úlceras se cubren por una zona fibrosa que se infiltra con eosinófilos (Espinosa-Cantellanos y Martínez-Palomo, 2000). En este punto las células inmunitarias están ausentes dentro de las lesiones, pero el tejido circundante tiene neutrófilos e infiltrado de células plasmáticas. También se observa que las lesiones avanzadas tienen una inflamación relativamente leve en comparación con el grado de destrucción del tejido (Prathap y Gilman, 1970).

Las *úlceras nodulares* son redondeadas, de un diámetro entre 1 y 5 mm, con áreas de mucosa ligeramente elevadas y áreas necróticas, deprimidas o hemorrágicas rodeadas por un borde de tejido edematoso. A menudo estas áreas están llenas de un material mucoso y amarillento denominadas como úlceras en botón de camisa (Espinosa-Cantellanos y Martínez-Palomo, 2000).

Las *úlceras irregulares* tienen de 1 a 5 cm de longitud, se encuentran habitualmente en el ciego y en el colon ascendente, sus márgenes suelen ser elevados, edematosos y la úlcera se llena de fibrina (Espinosa-Cantellanos y Martínez-Palomo, 2000) (Figura 3).

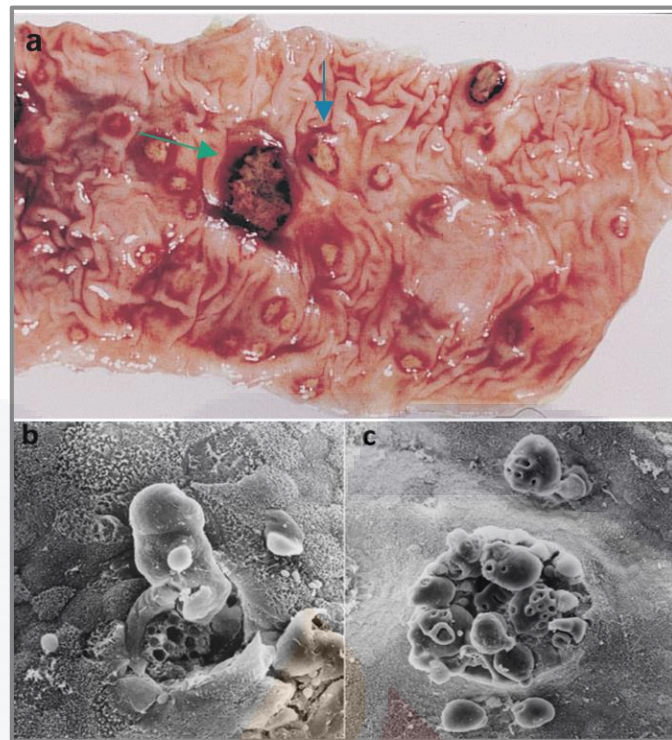


Figura 3. Formación de úlceras y proceso de migración mediado por el parásito. (a) En la imagen se observan las lesiones características de la amibiasis intestinal invasiva en pacientes susceptibles; la formación de úlceras nodulares (flecha azul) e irregulares (flecha verde) las cuales muestran áreas redondeadas, ligeramente elevadas con centros necróticos y hemorrágicos (b-c) Micrografías electrónicas del proceso de invasión, los trofozoítos se adhieren al epitelio glandular, se observa una región interglandular con microinvasión y ulceraciones superficiales, además se puede observar etapas más avanzadas ya que se muestran trofozoítos a través de una úlcera previamente formada (Modificado de Espinosa-Cantellanos y Martínez-Palomo, 2000).

Para mediar el proceso de migración o la invasión extraintestinal, algunos estudios muestran que los trofozoítos podrían utilizar la *EhCP5* y una molécula tipo integrina llamada $\beta 1\text{EhFNR}$ (receptor de fibronectina tipo integrina $\beta 1$) (Talamás-Rohana *et al.*, 1998), la cual interacciona a través del motivo RGD (motivo de integrina que reconoce Arginina-Glicina-Asparagina) para sujetarse y desplazarse a lo largo de la matriz extracelular de los endotelios, y desplazarse a lo largo de la vasculatura. En modelos de AHA en hámster se ha visto que durante las primeras etapas de la infección en el hígado, las amibas secretan factores citotóxicos que alteran los componentes de las células endoteliales sinusoidales hepáticas (Rigothier *et al.*, 2002), las cuales pueden sufrir apoptosis (Blazquez *et al.*, 2007;

Faust *et al.*, 2011) lo cual conlleva a una alteración de su estructura lo que facilita el paso de los trofozoítos de la circulación hacia el hígado. Además, se ha visto que la fenestración del endotelio sinusoidal hepático que permite la salida de plasma hacia el espacio de Disse puede también ayudar a la migración de los trofozoítos al parénquima hepático (Mortimer y Chadee., 2010).

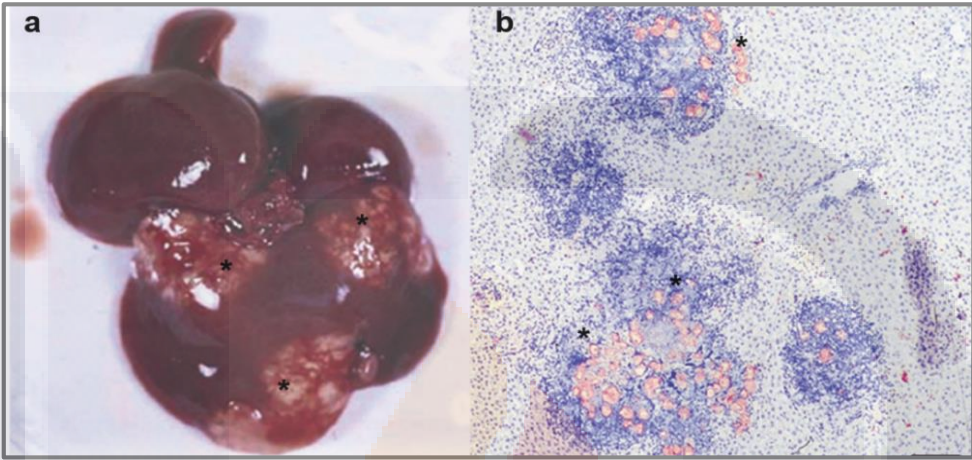


Figura 4. Formación del absceso hepático amibiano en hámster. (a) se observa el hígado con una gran cantidad de micro abscesos (*) formados por el patógeno. (b) corte histológico del hígado donde se observan en azul el infiltrado inflamatorio y en rosa (*) los trofozoítos del parásito (Modificado de Faust *et al.*, 2011).

Una vez establecidos en el tejido éstos se dividen e inducen la formación de abscesos (Rigothier *et al.*, 2002) que dependen de la expresión de los factores de virulencia como Gal-GalNac (Katz *et al.*, 2002), los amebaporos A (Bracha *et al.*, 2003), *EhCP5* (Ankri *et al.*, 1999) se pueden observar región necrótica que contiene células inflamatorias y hepatocitos lisados rodeado por un anillo de trofozoítos móviles y algunas células inflamatorias que delimitan el absceso del tejido hepático (Tsutsumi *et al.*, 1984; Rigothier *et al.*, 2002; Faust *et al.*, 2011) (Figura 4).

1.2.4 Respuesta Inmune del Hospedero

El tracto gastrointestinal está revestido por un epitelio altamente permeable que interactúa con un enorme número de microorganismos. El colon es la región más densamente poblada del tracto gastrointestinal (Artis, 2008). Por lo tanto, además de su función de absorción, la mucosa gastrointestinal debe regular fuertemente las respuestas inmunes hacia patógenos sin activar dicha respuesta frente a la flora microbiana inofensiva (Nenci *et al.*, 2007). Para ello, debe discriminar con precisión entre los organismos comensales y patógenos (Shi *et al.*, 2017). En éste sentido, se sabe que los componentes amebianos inducen una respuesta citoprotectora en el epitelio intestinal (Kammanadiminti y Chadee, 2006), lo que indica que *E. histolytica*, al igual que otros microorganismos comensales, ha evolucionado para modular la señalización de las CEI para que no se produzca de una forma inicial la respuesta inflamatoria, la cual, posteriormente se presenta a lo largo de la infección.

Las CEI son las primeras células que contactan con antígenos (bacterias, parásitos y virus), su reconocimiento es crítico tanto para la iniciación como para la regulación de la respuesta inmune (Shi *et al.*, 2017). Durante la fase inicial de la infección por *E. histolytica*, las CEI reconocen al patógeno vía TLR 2 y 4, que activan a su vez al NF- κ B y conduce a la producción de citocinas inflamatorias, incluyendo las interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Gay y Gangloff, 2007; Galván-Moroyoqui *et al.*, 2011). El IFN- γ está implicado en la eliminación de la infección, mientras que la IL-4 y el TNF- α están asociados con el desarrollo de la enfermedad (Sánchez-Guillén *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2011). La IL-4 está involucrada en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Wang *et al.*, 2000), éste tipo de respuesta está asociada con la patología de la enfermedad, mientras que la respuesta Th1 induce un efecto protector (Campbell y Chadee, 1999). Sin embargo, para que el perfil Th1 se presente, es necesaria la presencia de citocinas como la IL-12 y el IFN- γ , se ha visto que en estudios de pacientes con absceso hepático amebiano los niveles de éstas citocinas se mantienen bajos (Bekker *et al.*, 2000).

Por otro lado, la IL-10 juega un papel muy importante en el mantenimiento de la barrera epitelial (Prathap and Gilman, 1970; Chadee and Meerovitch, 1985). En modelos de ratones deficientes de IL-10, se observa que éstos presentan barreras epiteliales altamente permeables y desarrollan inflamación intestinal espontánea en respuesta a la flora

microbiana normal (Madsen *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que la IL-10 mejora la producción de MUC2, induce el cambio de isotipo hacia inmunoglobulina A (IgA), tiene efectos anti-apoptóticos en las CEI, reduce la señalización proinflamatoria de NF- κ B y promueve la inducción de células T reguladoras (Treg) (Zhou *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005).

1.2.5 Respuesta Inmune Celular

La importancia de la inmunidad celular en el control de la amibiasis se ha abordado de diferentes puntos de vista y en diferentes modelos experimentales, en algunos de ellos se ha demostrado la capacidad de las células de controlar la infección como por ejemplo los eosinófilos y neutrófilos activados capaces de matar al parásito en condiciones *in vivo* e *in vitro* (López-Osuna *et al.*, 1992; Velázquez *et al.*, 2008), en otros el efecto de los macrófagos peritoneales de hámsteres (Shibayama *et al.*, 2008) y humanos (Salata y Martínez-Palomo 1986) frente a los trofozoítos, y por último el papel de los linfocitos T específicos durante la formación del absceso hepático amibiano (Shibayama *et al.*, 2008), así como también el papel que juegan estas células en el desarrollo de la enfermedad. Frente a esta perspectiva es necesario comprender que durante estos mecanismos la resolución de la enfermedad o la progresión de la misma dependen tanto de la capacidad del huésped para eliminar al parásito así como la capacidad del parásito de evadir dicha respuesta.

Los neutrófilos han sido reconocidos durante mucho tiempo como una de las células más importantes para la eliminación de microorganismos invasores (Nathan *et al.*, 2006; Segal, 2008; Papayannopoulos *et al.*, 2009; Amulic *et al.*, 2012). No sólo son las células más abundantes en sitios inflamatorios, sino también son los primeros en interactuar con los patógenos como es el caso de *E. histolytica* (Chadee y Meerovitch, 1984; Tsutsumi *et al.*, 1984; Jarillo-Luna *et al.*, 2002). En modelos animales de absceso hepático amebiano, los neutrófilos se han encontrado en el hígado desde los 30 minutos de haber sido llevada la inoculación con los trofozoítos amebianos (Chadee y Meerovitch, 1984, Tsutsumi *et al.*, 1984; Tsutsumi y Martínez-Palomo, 1988). El efecto amebicida de éstas células depende específicamente de su activación, en estudios *in vitro* se compararon los neutrófilos humanos activados con IFN- γ y TNF- α de aquellos que no había recibido estímulo por éstas citocinas, se encontró que los primeros muestran un aumento del 97% en la capacidad de destruir amibas, mientras que los que no recibieron estímulo no presentan dicha capacidad

(Denis y Chadee, 1989). Por otro lado también se ha observado que su activación depende de la estimulación de sus receptores específicos de antígenos (Hickey y Kubes, 2009), donde a través del LPPG de la amiba provoca cambios importantes en los neutrófilos que promueven la liberación de moléculas oxidativas como el anión superóxido, el H_2O_2 , ON y los peroxinitritos, así como mecanismos no oxidativos como la liberación de mieloperoxidasa (MPO) (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011), además de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (Mayer-Scholl *et al.*, 2004) compuestas de ADN unido con componentes antimicrobianos (por ejemplo, proteínas que aumenta la permeabilidad bacteriana, mieloperoxidasa, elastasa, lactoferrina) (Hermosilla *et al.*, 2014). Se ha visto que durante este proceso la participación de los macrófagos para la estimulación de neutrófilos es importante ya que éstos al liberar citocinas como la IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α prolongan la vida útil de los neutrófilos en los sitios de inflamación (Kumar y Sharma, 2010).

Los macrófagos, otra de las células efectoras principales durante la infección amibiana, presentan un conjunto de características muy importantes que permiten la destrucción de *E. histolytica* (Salata y Radvin, 1985). Éstos presentan una gran actividad amebicida cuando son activados (*in vitro* e *in vivo*) por INF- γ , TNF- α , lipopolisacáridos y factor estimulante de colonias 1 (FEC-1) (Lin y Chadee, 1992). El mecanismo efector de los macrófagos depende del contacto directo célula-patógeno, lo cual provoca la activación y mecanismos efectores citotóxicos dependientes de la L-arginina a través de la producción de óxido nítrico (NO) (Paulnock, 1994) así como las dependientes de la liberación de proteasas citolíticas (Seguin *et al.*, 1997). Por otro lado los macrófagos expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II para la participación efectiva como células presentadoras de antígeno a linfocitos T CD4⁺, donde la transcripción de los genes de MHC II es inducida por IFN- γ (Paulnock, 1994).

En lo que respecta a los linfocitos T en la amibiasis, se ha observado que las células T CD4⁺ estimuladas por el antígeno producen IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-13, los T CD8⁺ producen poco IFN- γ pero más IL-17 (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). La IL-17 induce la infiltración de neutrófilos, aumenta la secreción de mucina, péptidos antimicrobianos e IgA. (Guo *et al.*, 2010).

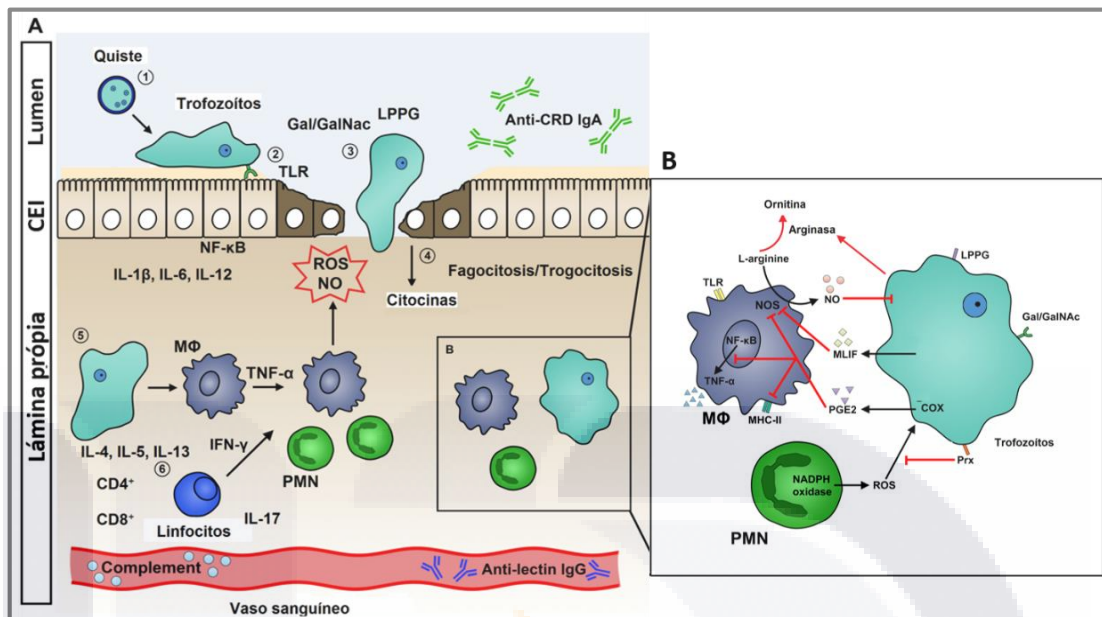


Figura 5. Respuesta inmune durante la infección. A) (1) En la luz del intestino grueso, los quistes del parásito llevan a cabo división celular para la formación de trofozoítos infectantes, (2) estos se unen a las CEI las cuales están cubiertas por una capa de moco (mucina glicoproteína secretada por las células caliciformes) que contiene anticuerpos secretados como la IgA. (3) La lectina Gal-GalNac y LPPG en la superficie de la ameba se une a TLR-2 de las CEI, provocando la activación de NF- κ B y la liberación de citocinas pro-inflamatorias (4) Las CEI lesionadas son fagocitadas/trogocitadas por los trofozoítos, los cuales comienzan a diseminarse al tejido. (5) Las citocinas liberadas activan a macrófagos, los cuales liberan TNF- α , ROS y ON. (6) Por otro lado hay activación de células TCD4⁺ y CD8⁺. Las células TCD4⁺, producen IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-13, y las células TCD8⁺, producen IL-17. La IL-17 induce la infiltración de neutrófilos y aumenta la secreción de mucina, péptidos antimicrobianos e IgA. B) Por otro lado las amebas frente a la respuesta inmune del huésped, estas pueden inhibir el estallido respiratorio de los macrófagos usando la enzima arginasa la cual convierte la L-arginina, un sustrato del ON, en L-ornitina, esto conduce a que los macrófagos ya no puedan producir más ON. Esto agota el suministro de L-arginina que los macrófagos utilizan para producir ON (Modificado de Moonah *et al.*, 2013).

Las células asesinas naturales (NK) y asesinas naturales T (NKT) están situadas en asociación con el epitelio y la lámina propia, recientemente se han encontrado distintas poblaciones de células NK., las cuales secretan IL-22 una citocina importante requeridas para la función citotóxica (Sato-Takayama *et al.*, 2008), además ésta citocina está

involucrada en el mantenimiento de la integridad epitelial al estimular la inducción de péptidos antimicrobianos (Zheng *et al.*, 2008; Moonah *et al.*, 2013).

Al igual que el intestino, el hígado requiere un ambiente inmune tolerogénico debido a que éste entra en contacto con grandes cantidades de antígenos derivados de los alimentos y productos microbianos provenientes del intestino (Rigothier *et al.*, 2002). En lo que respecta a la respuesta inmune en el hígado, ésta se encuentra formada por varias células inmunitarias incluyendo las células de Kupffer, DC, células T, células NK, células NKT, macrófagos y neutrófilos (Crispe, 2009). La respuesta hepática neutrófilica presenta la misma dicotomía que la patogénesis intestinal. Se puede observar un anillo de infiltrado inflamatorio principalmente de neutrófilos rodeando a los trofozoítos que causan las lesiones tempranas en el tejido (Gordon, 2003). La segunda ola de células presentes durante la infección está marcada por una afluencia de macrófagos los cuales una vez ubicados en el tejido son promovidos a la liberación de IL-8, IL-10, IL-12p40, y TNF (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). En este sitio estas células están asociadas a la formación de granulomas debido al perfil (Th2) de citocinas (IL-4 e IL-13) que polarizan la activación de macrófagos activados alternativamente (macrófagos M2) (Gordon, 2003; Wilson *et al.*, 2007). Las células NKT son de gran interés por su particular función y por su abundancia en el hígado (aproximadamente 30% de los linfocitos). Las células NKT tienen la capacidad de secretar diversas citocinas como IFN- γ , IL-4 o IL-17 (Moonah *et al.*, 2013; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016) las cuales pueden también determinar el tipo de respuesta inmune que se va a generar en el hígado (Figura 5).

1.2.6 Respuesta Inmune Humoral

Uno de los componentes importantes para el mecanismo de defensa del hospedero es la producción de inmunoglobulinas (Igs) en el intestino, las inmunoglobulinas desempeñan papeles importantes en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Peterson *et al.*, 2007). La IgA secretora (sIgA) es una de las inmunoglobulinas más abundantes producidas por las células plasmáticas ubicadas dentro de la lámina propia (Lamm, 1998) cumple muchas funciones dentro de las cuales se encarga de obstaculizar los epítomos microbianos que median la adherencia a CEI, neutraliza los productos inflamatorios, facilita el muestreo de antígenos por las células M y se une a antígenos que penetran la barrera epitelial para que estos sean transportados de nuevo al lumen intestinal (Fagarasan y Honjo, 2003,

Cerutti y Rescigno, 2008). En el caso de la amibiasis se ha observado que la IgA es crítica para la resistencia a la colonización y la invasión amibiana debido a la capacidad de unión a la lectina Gal-GalNac presente en este parásito (Rivera *et al.*, 2003). Haque *et al* (2003) detectaron en muestras de heces fecal niveles altos de IgA en pacientes con AHA y que estos niveles se mantenían altos después de varios días, lo cual puede ayudar a estos mismos pacientes a la eliminación del patógeno si se presenta una segunda infección. En otro estudio se mostró que la IgA específica contra la Gal-GalNac estaban asociados con la capacidad de los pacientes de recuperarse durante el desarrollo de la enfermedad y permanecer libres de la infección intestinal (Abd-Alla *et al.*, 2006). Por otro lado se ha observado que la presencia de IgG tienen tanto efectos protectores como no protectores sobre la susceptibilidad a las infecciones amibianas lo cual depende de las subclases de IgG inducidas durante la enfermedad es decir, IgG1 e IgG2 (Kaur *et al.*, 2004; Bernin *et al.*, 2014). Algunos estudios han reportado que al comparar los sueros de niños con AHA encontraron que en aquellos que presentaron altos niveles de IgG fueron los niños que desarrollaron más la enfermedad en comparación de que aquellos niños en donde los niveles de IgG se mantenían bajos. (Kaur *et al.*, 2004).

1.3 Tratamientos contra la amibiasis

Los tratamientos utilizados para combatir ésta y otras afecciones parasitarias, se tratan específicamente con medicamentos derivados de los nitroimidazoles como es el metronidazol. El metronidazol se ha establecido como el tratamiento más eficaz de la amibiasis. Debido a la alta prevalencia de ésta y otras infecciones (Upcroft y Upcroft, 2001) el metronidazol ha sido incluido en la lista de "medicamentos esenciales" por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2007). Éste fármaco tiene buena biodisponibilidad y excelente distribución en todos los tejidos, penetra fácilmente en las membranas celulares (difusión pasiva) y se convierte en su forma activa solamente en microambientes con potencial de óxido-reducción. Para que se lleve a cabo su activación el metronidazol requiere de la reducción del grupo nitro para ser transformado en su forma citotóxica como es el anión nitro radical (Muller, 1983; Leitsch *et al.*, 2007). El grupo nitro activado se somete a una reducción adicional de modo que se genera el nitrosoimidazol (Moreno y Docampo, 1985) que puede reaccionar con grupos sulfhidrilo (West *et al.*, 1982) y con el DNA (Ludlum *et al.*, 1988). Dado que la reducción del grupo nitro es esencial para la toxicidad de este

fármaco se ha realizado una serie de estudios en hígado de rata, donde se ha encontrado que la enzima responsable de la activación de este fármaco es el citocromo P450 (West *et al.*, 1982) la cual es una enzima encargada del metabolismo de fármacos encontrada en el retículo endoplásmico y en la mitocondria (Barnaba *et al.*, 2017).

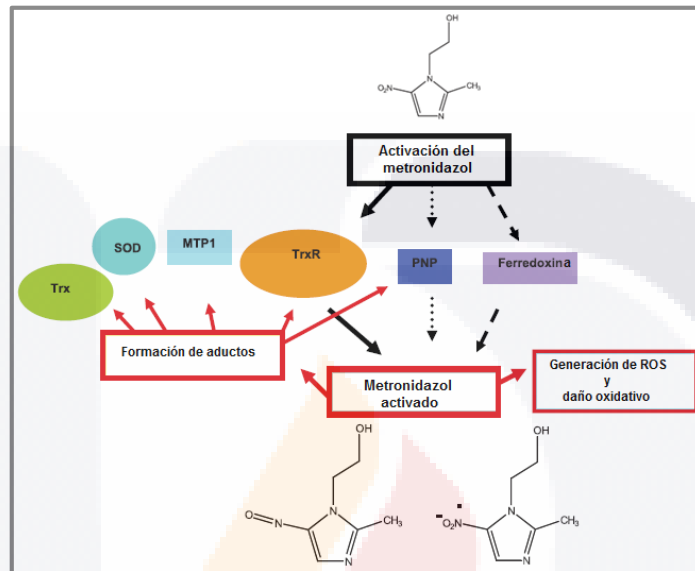


Figura 6. Forma de activación del metronidazol y su mecanismo acción en *E. histolytica*. El metronidazol se reduce de manera monovalente por la tiorredoxina, después de su activación se forma el anión nitroradical o, nitrosoimidazol. El anión nitroradical puede reducir el oxígeno (O₂) y por lo tanto generar especies reactiva de oxígeno. El nitrosoimidazol forma aductos con grupos tioles de proteínas, principalmente de la tiorredoxina reductasa (TrxR), la tiorredoxina (Trx), la superóxido dismutasa (SOD) y purina nucleósido fosforilasa (PNP) (Modificado de Leitch *et al.*, 2007)

En el caso de *E. histolytica* que carece de mitocondrias (Meza *et al.*, 1994) pero depende de la fosforilación a nivel de sustrato (Muller, 1983) el metronidazol se reduce de manera monovalente principalmente por la tiorredoxina reductasa o ferredoxina (Leitsch *et al.*, 2007). Ésta reducción origina el intermediario radical libre nitro que posteriormente es reducido a nitrosoimidazol, el cual es capaz de formar aductos en la tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y superóxido dismutasa en los trofozoítos amibianos (Leitsch *et al.* 2007) (Figura 6) lo que provoca un gran daño en la amiba llevando a cabo su eliminación. Sin embargo, a un que este medicamento es efectivo como tratamiento contra la amibiasis, todavía hay una preocupación con respecto a su potencial papel genotóxico y carcinogénico

en células humanas. (Bendesky *et al.*, 200) además de los efectos secundarios que se presentan durante su administración (Bansal *et al.*, 2006).

Por otro lado, una de las razones por la que la amibiasis continúa siendo un grave problema de salud en los países pobres es que ningún fármaco, incluyendo al metronidazol, tiene efectos citotóxicos sobre los quistes del parásito (Powell *et al.*, 1999). El mejoramiento de los sistemas de purificación de agua y prácticas de higiene podría ser una medida que pueda disminuir la incidencia de la enfermedad, pero esto requerirá un cambio considerable en las políticas gubernamentales e inversiones monetarias (Quach *et al.*, 2014), por estas razones, el desarrollo de una vacuna y la introducción de programas de vacunación en los países en desarrollo representa una alternativa atractiva. En relación con los tratamientos farmacológicos, las vacunas son rentables, seguras y tienen menos efectos secundarios indeseables (Black *et al.*, 2010). Además, presentan altas tasas de protección y han demostrado ser eficientes en el control de muchas enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la vacuna contra la poliomielitis ha sido una de las más exitosas, resultando en un 99% de reducción de casos de poliomielitis desde 1988 hasta 2003 en todo el mundo (WHO, 2004).

1.4 Vacunas

1.4.1 Generalidades de las vacunas

Las vacunas son uno de los logros más significativos de la medicina ya que contribuye a mejorar la morbilidad, la mortalidad y, por otra parte, a mejorar la calidad vida en el mundo (WHO, 2009; Black *et al.*, 2010). Los seres humanos se han beneficiado de las vacunas durante más de dos siglos desde el descubrimiento de la vacuna contra la viruela por Edward Jenner (1749-1823) en 1798 (Black *et al.*, 2010; Lahariya, 2010) a partir de ello desde hace tiempo y hasta ahora una serie de vacunas han estado disponibles. Algunos datos muestran que existen vacunas autorizadas contra casi 27 agentes y, en desarrollo se tienen vacunas candidatas casi contra 130 (WHO, 2009). Una vacuna, según la definición tradicional, es una sustancia formada por un microorganismo completo atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaz de inducir una respuesta inmune protectora y duradera (Pulendran, 2011), las cuales ayudan en el desarrollo de anticuerpos protectores en el

cuerpo del individuo al que se administra, y la protección está disponible después de un período de latencia de algunas semanas a varios meses (Plotkin *et al.*, 2013; Seigrest, 2013). Las vacunas muestran un eficaz control de muchas enfermedades infecciosas (WHO, 2008) ya que según algunos datos epidemiológicos se calcula que alrededor de un 25% del total de muertes anuales (alrededor de 15 millones) se deben a agentes infecciosos (Morens *et al.*, 2004) y no sólo por la aparición de nuevos patógenos, sino también a la reaparición de microorganismos causantes de enfermedades con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (WHO, 2008). El mecanismo de acción de las vacunas se basa en generar de forma activa una respuesta inmune adquirida, donde los linfocitos B que se activen sintetizarán anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar los antígenos, al mismo tiempo, se induce la formación y proliferación de células de memoria que permanecerán en el torrente sanguíneo con el objeto de estar preparadas para desencadenar una respuesta inmune rápida (Kurstak *et al.*, 2003).

Existen diferentes tipos de vacunas dentro de las cuales se encuentran las vacunas de microorganismos vivos o atenuados, muertos (inactivados), conjugados, de subunidades y recombinantes (Hanley, 2011). Cada una de ellas con una función en particular y con un tiempo de duración específico, como por ejemplo las vacunas de microorganismos vivos proporcionan protección larga con una única dosis, las vacunas de microorganismos muertos usualmente requieren dosis múltiples para una respuesta primaria satisfactoria (Pandey *et al.*, 2016). Los intervalos pueden ser mínimo de cuatro semanas entre dosis o de 8 semanas. En aquellas que se necesiten refuerzos las dosis se dan generalmente a los 6 meses o más después de la primera aplicación. Las dosis de refuerzo tienen una respuesta de anticuerpos rápida y mayor, una mayor duración de la protección lo cual está vinculado a la respuesta inmune secundaria (Paoletti *et al.*, 2001)

1.4.2 Clasificación de las vacunas

1.4.2.1 Vacunas convencionales

Se denominan vacunas convencionales o clásicas a las vacunas inactivadas (compuestas por bacterias, virus o partes de ellos), vacunas vivas atenuadas (formadas por bacterias o

virus cuya virulencia ha sido reducida) y vacunas de subunidades (consisten en fragmentos de proteínas antigénicas pertenecientes a patógenos).

-*Vacunas vivas atenuadas*: Su principal característica consiste en el empleo de un organismo infeccioso viable con virulencia reducida o con la capacidad de causar la enfermedad: los agentes infecciosos pueden atenuarse, químicamente, genéticamente o mediante otros factores (Hanley, 2011). Estas vacunas proporcionan en teoría una vacunación ideal de larga duración y muy intensa, ya que dan lugar a una infección similar a la natural. Sin embargo, plantean un riesgo al estar formadas por microorganismos vivos, ya que es posible que éstos mantengan su actividad patógena y desencadenen la enfermedad (Salleras, 2002).

-*Vacunas inactivadas*: Son aquellas que contienen microorganismos muertos, inactivados mediante diversos métodos físicos y químicos (De Gregorio *et al.*, 2013). Con este tipo de vacuna no existe el riesgo de desencadenar la enfermedad tras la vacunación. La respuesta inmunitaria suele ser menos intensa y duradera, prevaleciendo la respuesta de tipo humoral. Para una buena estimulación se necesitan administrar varias dosis (Salleras, 2002).

-*Vacunas de subunidades*: son vacunas derivadas de componentes del organismo causante de la enfermedad, tales como proteínas específicas y polisacáridos. Estas vacunas se suelen emplear cuando han sido aislados los componentes responsables de la patogenicidad del agente infeccioso, ya que de esta forma se evita el riesgo de desencadenar la enfermedad tras la vacunación (Akira *et al.*, 2006).

1.4.2.2 Vacunas de nueva generación

Hasta hace pocos años, la síntesis química del antígeno y el aislamiento de la proteína antigénica a partir de su fuente natural eran los únicos métodos disponibles para la obtención de componentes inmunizantes en las vacunas (Vogel y Alving, 2002). El progreso en la inmunología, microbiología, genética y biología estructural ha proporcionado un nuevo conjunto de herramientas para abordar el desarrollo de vacunas de nueva generación (Delany *et al.*, 2014). Es probable que las vacunas de nueva generación muestren mejoras

en áreas claves tales como el desarrollo de nuevas clases de adyuvantes (Rupnow *et al*, 2009) de vacunas que pueden promover mejores respuestas inmunitarias humorales y celulares (Castillo-Solórzano *et al*, 2011), la presentación óptima de antígenos al sistema inmune y además, la fabricación de vacunas utilizando métodos de producción sintéticos altamente caracterizados (Hoebe *et al*, 2004).

-*Vacunas atenuadas* mediante modificación genética: Este tipo de vacunas se basa en la identificación de genes relacionados con factores virulentos y mutantes en el genoma del patógeno, de esta forma, se han desarrollado virus y bacterias modificados genéticamente de manera que sus genes relacionados con la patogenicidad se encuentren deletados o modificados (Gheorghe *et al.*, 2013).

-*Vacunas sintéticas*: están basadas en componentes sintéticos tales como ácidos nucleicos o péptidos sintéticos, polisacáridos, o antígenos (Garver *et al*, 2005). Las proteínas bacterianas o virales con capacidad antigénica presentan múltiples fragmentos (epítomos) que determinan su especificidad y actividad, pero sólo un número limitado de ellos está relacionado con una respuesta protectora eficaz (Tregnaghi, 2002).

-*Vacunas anti-idiotipo*: La idea básica de las vacunas anti-idiotípicas es la de utilizar en lugar de un antígeno, un anticuerpo que reproduzca la morfología del antígeno y que por lo tanto induzca inmunidad, pero que sea de por sí inocuo (McCarthy *et al.*, 2003).

-*Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes*: La tecnología del DNA recombinante permite aislar determinados genes que llevan la información para las proteínas que se encuentran en la superficie del patógeno contra el que se quiere obtener una vacuna (Ma *et al.*, 2003).

-*Vacunas génicas*: La principal característica de las vacunas génicas es que el antígeno inmunizante no se administra directamente en el paciente a vacunar, sino el gen que lo codifica, el cual dirige la síntesis de este antígeno por parte de las células del huésped (Wei *et al.*, 2004).

1.4.3 Mecanismos Inmunológicos de las vacunas

1.4.3.1 Inmunología de las vacunas de mucosas

Las vacunas orales que se dirigen preferentemente a la mucosa intestinal constituyen una estrategia amplia para prevenir la enfermedad clínica causada por una serie de patógenos entéricos, incluyendo aquellos que colonizan la mucosa intestinal sin invasión o daño morfológico y provocan diarreas acuosa por los efectos de potentes enterotoxinas (Czerkinsky *et al.*, 2015). Los patógenos entéricos difieren en la forma en que causan la infección y la enfermedad, lo que a su vez determina la naturaleza de las respuestas inmunitarias subsiguientes y, por tanto, los mecanismos de protección inmunológica involucrados (Brandtzaeg, 2009). Las correspondientes vacunas orales activan una amplia gama de mecanismos inmunes innatos y adaptativos. El sistema inmune innato proporciona la primera línea de defensa y se activa a través de la interacción entre los RRP, incluyendo los TLRs y las múltiples moléculas, pero generalmente conservadas (incluyendo toxinas producidas por patógenos) de antígenos derivados de patógenos (Kim, 2017), tales interacciones conducen a la producción de defensinas antimicrobianas así como quimiocinas y citocinas, que a su vez pueden atraer y activar a las células presentadoras de antígeno (CPA) para iniciar el desarrollo de las respuestas inmunes humorales y mediadas por células T. Las vacunas deben ser formuladas para prevenir que el agente infeccioso sea capaz de adherirse y colonizar el epitelio mucoso (translocación a través y/o replicación dentro del epitelio y lámina propia), de llegar al torrente sanguíneo y extenderse a tejidos adyacentes, de neutralizar o prevenir la unión de toxinas microbianas (principalmente enterotoxinas) a células diana (Germanier *et al.*, 1975; Pasetti *et al.*, 2011)

Para que esto se pueda llevar a cabo, las vacunas que son suministradas ya sea vía oral o respiratorias deben ser capaces de activar los principales mecanismos inmunitarios efectores adaptativos para la protección específica contra las infecciones entéricas como son: anticuerpos de tipo sIgA que pueden prevenir la colonización y la replicación intraepitelial local de patógenos intestinales y también pueden neutralizar virus y enterotoxinas, anticuerpos (Pasetti *et al.*, 2011) IgG sistémicos que pueden neutralizar (por ejemplo, poliovirus) y activar direccionalmente la muerte mediada por el complemento y la opsonización-fagocitosis de bacterias (por ejemplo, *Salmonella typhi*) (Germanier *et al.*,

1975) y mecanismos citotóxicos dependientes de anticuerpos y células T para eliminar células huésped infectadas por bacterias intracelulares (por ejemplo *S. typhi*) y virus (por ejemplo, rotavirus) (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

1.4.3.1.1 Anticuerpos secretores en mucosas

La sIgA representa dos tercios de toda la inmunoglobulina producida en mamíferos y es producida por las células plasmáticas en la lámina propia intestinal en un proceso regulado por citocinas como la IL-2, IL-5, e IL-10 secretadas por células T CD4⁺ (Th2), por ácido retinoico, IL-10, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IL-6 secretado por DC y por CEI (Soloff *et al.*, 2010). Donde es transportada selectivamente en el lumen intestinal por enterocitos a través de un mecanismo único mediado por receptor (Mostov *et al.*, 2003). SIgA proporciona la primera línea de defensa contra la colonización bacteriana, la replicación de virus y la unión de enterotoxina a las células epiteliales intestinales (Brandtzaeg, 2009). Además, sIgA puede participar en respuestas anti-inflamatorias (Boullier, 2009). SIgA es producida por células plasmáticas IgA⁺ que residen en el intestino en lámina propia (Cerutti, 2008). Después una inmunización oral, las células B vírgenes activadas por antígenos vacunales (solubles o asociados a CDs) se agrupan en los folículos linfoides asociados a la mucosa formando centros germinales o migran a centros germinales ganglionares periféricos, donde se expanden clonalmente, se diferencian y experimentan maduración de la afinidad (Mora *et al.*, 2006). Las células plasmáticas que secretan grandes cantidades de IgA de alta afinidad, pueden permanecer en el tejido linfoide de origen o pueden migrar a través de la linfa a la sangre para poblar sitios distantes (Brandtzaeg, 2009). Se han descrito dos subclases de IgA en seres humanos. IgA1 predomina en la mucosa nasal y bronquial, saliva y el intestino delgado proximal (es la principal subclase producida por el sistema inmunológico), mientras que la IgA2 predomina en el intestino delgado y el colon (Kett *et al.*, 1986; Brandtzaeg, 2007). La IgA2 es resistente a las proteasas sintetizadas por una variedad de bacterias potencialmente patógenas y es más adecuada que la IgA1 para tratar con la densa cantidad microbiana en el intestino grueso (Brandtzaeg 2007; Cerutti, 2008). En el caso de la IgG relativamente pequeñas cantidades se sintetizan en el tracto gastrointestinal de individuos sanos, pero se observan niveles más altos en sujetos con enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad celíaca) (Shearman *et al.*, 1972;

Brandtzaeg, 2009). Dado el hecho de que la IgG y el complemento son sensibles a la degradación proteolítica en el medio intestinal, el papel protector de la IgG intestinal parece ser limitado (Yoshida *et al.*, 2004).

La inmunoglobulina IgM secretora también se encuentra en las secreciones intestinales a concentraciones relativamente más bajas que sIgA, pero su concentración se incrementa en una gran proporción de individuos con deficiencia selectiva de IgA en la que compensa la falta de sIgA. Los bajos niveles de IgE también son producidos por las células plasmáticas intestinales y se cree que protegen contra los helmintos intestinales (Kim, 2017).

1.4.3.1.2 Inmunidad mediada por células en mucosas

Las células M y las CDs son las responsables de la captura, transporte, procesamiento y presentación del antígeno, mientras que los linfocitos B y T desempeñan funciones efectoras inmunitarias especializadas (es decir, secreción de anticuerpos, citocinas y función citotóxica). Las DCs tienen una morfología única que incluye dendritas transepiteliales extendidas que les permite muestrear al antígeno directamente desde el lumen (Soloff y Barratt-Boyes, 2010). Dependiendo de su fenotipo (es decir CD11^{chi} convencional o DC de plasmacitoide) y el microambiente, las CDs de la mucosa intestinal montan respuestas inmunes distintas pero apropiadas a organismos comensales y patógenos, resultando en esta última instancia en la protección del tejido intestinal contra el daño (Soloff y Barratt-Boyes, 2010). Las CDs de las placas de Peyer del intestino delgado promueven la expresión de los receptores como la integrina α_4/β_7 y CCR9, específicos para la mucosa intestinal asociada a la adhesión de células de la mucosa a través de moléculas de adhesión (MAdCAM-1 y TECK/CCL5) en células T y B respectivamente (Johansson-Lindbom y Agace, 2007). En el caso de los antígenos transportados por las células M, estos son endocitados por CD inmaduras encontradas en el saco formado por las células M y transportados a zonas ricas de células T adyacentes o a ganglios linfáticos regionales, donde se produce maduración de las CD y presentación de antígeno a células T vírgenes. Las células T activadas en la mucosa intestinal (por ejemplo las placas de Peyer) migran rápidamente donde se diferencian en células T efectoras o de memoria; a partir de ahí, estas células entran en la circulación sistémica a través de la linfa y regresan a la lámina propia, donde residen. (Brandtzaeg, 2007) Se han descrito dos subconjuntos principales de

células T de memoria: células T de memoria central (TMC) y células T de memoria efectoras (TMEs) (Sallusto *et al.*, 2010). Los estudios en humanos y en ratones indican que la TMC tienen una alta capacidad proliferativa y, que además están implicados en respuestas de memoria en órganos linfoides secundarios. Las TME están presentes principalmente en los tejidos periféricos y están dotados de función efectora inmediata, pero sus propiedades proliferativas son limitadas. La mayoría de las células TMC expresan el receptor de quimiocinas CCR7, CD62L y CD45RO, mientras que las células TME expresan CD45RO en ausencia de CCR7, CD62L y CD45RA, por lo tanto, exhiben diferentes propiedades migratorias. La mayoría de las células T de memoria que residen en la lámina propia del intestino son células TME, mientras que las células TMC migran y patrullan entre órganos linfoides y parecen ser importantes en la generación de células efectoras TME (Czerkinsky *et al.*, 2015)

Por otro lado las células T reguladoras (Treg) pueden desempeñar un papel importante en el intestino manteniendo la tolerancia frente a los antígenos ambientales y la flora comensal, así como controlando respuestas inflamatoria a patógenos infecciosos (Izcue *et al.*, 2006). Entre los numerosos subconjuntos de Treg identificados, se ha demostrado que las células CD4⁺ Tr1 secretoras de IL-10 previenen la inflamación intestinal crónica. Las células Th3 secretoras de TGF- β participan en la tolerancia a los antígenos alimentarios; y TGF- β e IL-10 secretado por células T (FOXP3, CD4⁺) pueden prevenir respuestas auto-reactivas. El papel de diferentes células Treg en respuesta a la vacunación oral y en la defensa inmune contra los patógenos entéricos en los seres humanos sigue siendo en gran parte desconocido.

Las células Th1 productoras de IFN- γ y las células Th17 productoras de IL-17 se encuentran a menudo en altas concentraciones en lámina propia (McSorley, 2014). En el caso de las células B de memoria principalmente a través de la generación de células B de memoria de larga vida en los centros germinales de las placas de Peyer y de los folículos linfoides intestinales, puede explicar cómo la protección tras la vacunación oral puede persistir por mucho tiempo (Giannini, 2006), las células B de memoria pueden convertirse rápidamente en células productoras de anticuerpos de alta afinidad (IgA o IgG), que pueden entonces controlar la infección antes de que cause la enfermedad por ejemplo, después de la vacunación oral contra el cólera, se han mostrado células B de memoria funcionales para

respuestas IgA específicas del antígeno (Avery *et al.*, 2005). La mayoría de las células B de memoria expresan en su membrana marcadores como son CD19⁺, CD20⁺, CD27⁺, CD38⁺, IgD⁻, IgG⁺ o IgA⁺, mientras que las células plasmáticas expresan CD19⁺, CD20⁻/CD27^{hi}, CD38^{hi}, IgD⁻, IgG⁻, IgA⁻ (Crotty, *et al.*, 2004; Avery *et al.*, 2005).

1.4.3.2 Inmunología de las vacunas en la piel

La inmunización transcutánea (ITC) también conocida como administración transdérmica (TVD) es un método novedoso, seguro y no invasivo de inducir respuestas inmunes celulares y humorales específicas de antígeno mediante la aplicación directa sobre la piel. La piel, al igual que otras superficies epiteliales, cumple una función crucial en la regulación del intercambio de materia entre el cuerpo y el ambiente exterior. El papel de la piel como una barrera contra la pérdida de humedad, lesiones químicas o físicas y la entrada de patógenos ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, sólo en las últimas décadas se ha observado el papel activo de las células inmunes de la piel (Lawson *et al.*, 2010). Más recientemente, se ha explorado el concepto de usar la piel como un sitio de administración de vacunas (Belyakov *et al.*, 2004); la primera investigación de la vacunación tópica se llevó a cabo en 1997 (Tang *et al.*, 1997). Desde entonces, un número sustancial de artículos publicados han demostrado la viabilidad de la ITC como un método eficaz de administración de vacunas en animales y en seres humanos. La inducción de respuestas humorales y celulares tanto en los compartimentos sistémicos como en las mucosas es uno de los beneficios más notables de esta técnica (Glenn *et al.*, 1998).

Las células que están más implicadas en la respuesta inmune se encuentran dentro de las capas epidérmica y dérmica (Young *et al.*, 2006), para lograr una respuesta inmune eficaz, los antígenos aplicados a la piel deben atravesar las capas queratinizadas superiores de la piel para alcanzar las células inmunes. La parte externa de la epidermis, el estrato córneo, se compone de células no nucleadas muy queratinizadas rodeadas por moléculas lipídicas densamente empaquetadas (Wang *et al.*, 2008). Esta capa proporciona una barrera para la pérdida de humedad y la entrada de patógenos, y también limita la penetración de antígenos de gran peso molecular. Entre la epidermis y dermis podemos encontrar una gran cantidad de células inmunes las cuales incluyen a los queratinocitos, CDs de ubicación epidérmicas

y dérmicas, linfocitos T, células NK, mastocitos y macrófagos, entre otros (Kapsenberg y Bos, 1998).

Los *queratinocitos* son células epiteliales predominantes en la epidermis y son responsables de la producción de queratina, una proteína fibrosa que contribuye a la barrera protectora de la piel proporcionando soporte estructural (Young *et al.*, 2006). A través de su producción y de diversas citocinas y quimiocinas, los queratinocitos tienen un papel crucial en el mantenimiento de la estructura de barrera física de la piel, así como en la contribución a las respuestas inmunes innatas y adquiridas locales. La producción de citocinas y quimiocinas por los queratinocitos ocurre constitutivamente y en respuesta a diversos estímulos. La producción de citocinas por los queratinocitos induce la motilidad de las CPAs en la piel (Kissenpfennig y Malissen, 2006). Publicaciones recientes sugieren que los queratinocitos también pueden desempeñar un papel como células presentadoras de antígeno no profesionales porque expresan moléculas de MHC clase II y pueden presentar antígenos peptídicos a células T CD4⁺ y CD8⁺ (Black *et al.*, 2007), además de desempeñan un papel en la dirección de la respuesta inmune cutánea hacia un sistema celular o humoral, en la regulación del espesor de la epidermis y en la promoción del crecimiento, maduración y movilización de leucocitos de la sangre (Williams y Kupper 1996).

Las DCs son capaces de capturar, procesar y presentar eficazmente antígenos en sus superficies unidos a moléculas de MHC (I-II) en estrecha proximidad con moléculas coestimuladoras, en la piel podemos encontrar además de las células dendríticas, a las células de Langerhans (CL) las cuales son también abundantes. Tras la estimulación por antígenos (vacunas), los CD y las CL inician la captación de antígenos, se diferencian, maduran y migran a través de vasos linfáticos a los ganglios regionales, donde se ponen en contacto con células T y B. Dentro de la epidermis, las CL desempeñan un papel crítico en la presentación de antígenos (Wang *et al.*, 2008). Las CL comprenden aproximadamente el 2% de la población total de células epidérmicas; Sin embargo, estas células cubren más del 25% del área superficial total de la piel, su orientación paralela a la piel maximiza la exposición a antígenos extraños que entran por esta vía (Yu *et al.*, 1994)

Existen varios linfocitos T en la piel con distribución limitada en la epidermis y una población más prevalente en la dermis perivascular (Spetz *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2006). Aunque las

células T residentes en la piel son fenotípicamente diversas, la mayoría son células Th1, con menor número de células Th2, también podemos encontrar células de memoria y reguladoras, células Th17, linfocitos T epidérmicos CD8 $\alpha\beta$, linfocitos T CD4 $^+$ de memoria. Los macrófagos, las células NK y células T $\gamma\delta$ en las respuestas inmunitarias de la piel no han sido bien dilucidados, pero esta información sería útil para diseñar y formular vacunas transcutáneas de tal manera que generen respuestas inmunes deseadas (Warger *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha observado un aspecto muy interesante de las vacunas aplicadas de manera transcutánea la cual implica la activación de sistemas alejados del sitio de la introducción del antígeno. En modelos animales la inducción de respuestas humorales en tejidos mucosos después de la ITC ha sido ampliamente estudiada, donde se ha obtenido una inducción de anticuerpos IgG e IgA contra el antígeno inmunizante en los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (Lawson *et al.*, 2010). Los mecanismos involucrados en la regulación de estas respuestas no se conocen bien, estudios recientes han documentado la migración de los DC activadas en la piel a la mucosa intestinal. Chang *et al.* 2008 encontró células antígeno-específicas secretoras de anticuerpos (IgG e IgA) en el intestino delgado y del intestino grueso después de la ITC con toxina tetánica y toxina del cólera.

1.5 Vacunas contra agentes infecciosos

1.5.1 Vacunas contra parásitos

Las dificultades para desarrollar una vacuna contra la enfermedad parasitaria son complicadas no sólo por la necesidad de identificar (y producir) antígenos protectores apropiados, sino también por la falta de comprensión completa de los tipos de respuestas inmunitarias necesarias para dicha protección (Greenwood *et al.*, 2017). La presencia de huéspedes (animales) para muchos parásitos también limita la posibilidad de erradicar la enfermedad mediante la vacunación, ya que estos huéspedes alternativos pueden proporcionar un reservorio constante para la infección (Samuel y Stanley, 1997). Los parásitos protozoarios importantes son predominantemente parásitos intracelulares,

proporcionando así oportunidades limitadas para la protección mediada por anticuerpos. En el caso de la amibiasis causada por *E. histolytica* afortunadamente, la mayoría de estos problemas no se aplican ya que no hay vectores ni huéspedes secundarios implicados en la transmisión por lo cual una vacuna podría erradicar la enfermedad. Finalmente, *E. histolytica* es un parásito extracelular, proporcionando así un papel potencial para el desarrollo de la respuesta inmune humoral inducida por la vacuna contra la infección (Samuel y Stanley, 1997; Quach *et al.*, 2014).

1.5.2 Vacunas contra *Entamoeba histolytica*

El desarrollo de una vacuna eficaz contra este parásito parece ser una alternativa atractiva con buenas expectativas (Haque *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2006), la cual permitirá poder tener control sobre esta enfermedad. En el caso de la amibiasis no existe una vacuna, que se haya empleado para ensayos clínicos en humanos, mas sin embargo existen una gran cantidad de estudios en el desarrollo de vacunas para esta enfermedad usando modelos animales de experimentación (Stanley *et al.*, 1995; Lotter *et al.*, 1997; González-Vázquez *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2014). El objetivo de cualquier vacuna es desarrollar una inmunidad protectora de larga duración, además de despertar una respuesta inmunitaria específica para la eliminación del agente. En el caso de la amibiasis algunos autores mencionan que el objetivo de estas estrategias se podría enfocar en varios mecanismos de defensa, donde uno de ellos sea la respuesta inmune humoral específica de las mucosas, debido a que se impediría la colonización del parásito y la invasión (Mann *et al.*, 1997). De acuerdo con ello, un estudio reciente pone de manifiesto la asociación de los anticuerpos IgA dirigidos a epítopes específicos a la Gal-GalNac (Stauffer *et al.*, 2006). Por otra parte, la presencia de IgA fecal anti-Gal-GalNac en humanos se correlaciona con una disminución del riesgo intestinal a posibles reinfecciones (Haque *et al.*, 2000). En lo que respecta a la respuesta por linfocitos T CD4+ son consideradas también muy importantes para la estrategia de una vacuna, se observó en jerbos que la presencia de estas células también puede proteger de posibles reinfecciones, además en análisis de linfocitos humanos que presentaron infección por *E. histolytica* indican que en respuesta a la infección estas células producen citocinas del perfil Th1 como IL-12 e IFN- γ muy importantes para la eliminación del parásito (Guo *et al.*, 2011).

A continuación se describirán los estudios que se han hecho en *E. histolytica* para la obtención de vacunas y las estrategias empleadas por los autores.

1.5.2.1 Proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas.

Dentro de las proteínas que se han utilizado como inmunógenos contra *E. histolytica*, se encuentran: la proteína rica en serina (SREHP) (Zhang *et al.*, 1994), la Gal-GalNac (Samuel y Stanley, 1997), la lectina de 112 kDa (Martínez-López *et al.*, 2004), las peroxiredoxinas (Jiménez-Delgado *et al.*, 2004) y proteínas de heparán sulfato (HSBPs) (Kaur *et al.*, 2013).

En lo que respecta a las *proteínas ricas en serina (SREHP)*, se ha descrito que al presentar múltiples epítopes conservados, son reconocidos fácilmente por el sistema inmunitario provocando la producción de anticuerpos específicos. El análisis de sueros de pacientes que han desarrollado absceso hepático amibiano muestra la producción de una gran cantidad de anticuerpos que en su mayoría (80%) corresponden a anticuerpos frente a SREHP (Zhang *et al.*, 1994).

El antígeno *E. histolytica* de 29-kDa (*Eh29*) es una hidropéroxido reductasa de alquilo implicada en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno segregadas por la microflora o células inmunitarias (Bruchhaus *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el 54% de hámsters vacunados con *Eh29* no mostraron el desarrollo de AHA (Soong *et al.*, 1995). Un estudio posterior utilizando *Eh29* conjugado con subunidad B de la toxina del cólera (CTB) confería protección contra la amibiasis intestinal y además se detectaron anticuerpos IgA anti-*Eh29* y anticuerpos IgG (Carrero *et al.*, 2010).

En el caso de las *peroxiredoxinas* de 29 y 30 kDa estas inducen la proliferación de linfocitos y producción de anticuerpos IgG (Soong *et al.*, 1995; Jiménez-Delgado *et al.*, 2004). Las proteínas de unión a heparán sulfato (HSBP) probadas en modelos de cerdo de Guinea inducen una respuesta humoral mediada por IgG, IgM, e IgA (Kaur *et al.*, 2013). Martínez-López (2004), utilizó el polipeptido recombinante llamado *EhADH243* (243 aa) (dominio de adherencia 243 del complejo de la lectina de 112 kDa) de la adhesina *EhADH112* (adhesina de 112 kDa de *E. histolytica*), observan que al aplicar el *EhADH243* ya sea de forma nativa

o junto con el adyuvante completo de Freud (CFA) genera una protección de un 75 y 33% respectivamente.

Por otro lado se ha observado que la *Gal-GalNac* induce la producción de citocinas Th1 en modelos *in vitro* e *in vivo* y que al estimular macrófagos *in vitro* se ha encontrado la producción de (TNF- α) (Seguin *et al.*, 1997), IL-12 e INF- γ (Schain *et al.*, 1992) y además la presencia de anticuerpos de tipo IgG. En pacientes con absceso hepático amibiano se observó una gran cantidad de anticuerpos dirigidos hacia la subunidad de 170 kDa (Ravdin *et al.*, 1986), al parecer hay diferencias significativas en el nivel de inmunogenicidad dependiendo del dominio estructural de esta subunidad, ya que se observó en estos pacientes, un 95% de anticuerpos IgA específicos para los dominios ricos en cisteína. Lotter *et al* (1997) obtuvieron la proteína recombinante llamada r170kDa a partir de la subunidad pesada (170kDa) de la Gal-GalNac, la aplicación de esta proteína de forma directa, desarrolló un efecto protector (62.5%) en los animales inmunizados y retados con trofozoítos amibianos (cepa HM1-IMSS). Soong *et al* (1995) fragmentaron la subunidad pesada (170kDa) obteniendo cuatro fragmentos denominados LC1 (1-347aa, pobre en cisteínas), LC2 (347-758 aa-rica en cisteínas), LC3 (758-1134 aa rica en cisteína) y LC4 (1134-1263 aa región transmembrana), observan que el fragmento LC3 (porción rica en cisteínas) recombinante, induce una inmunidad humoral (IgG) alta frente a la amibiasis. A partir de estos estudios, Beving *et al* (1996) utilizaron el fragmento LC3 recombinante en ratones BALB/c, donde obtuvieron un 73% de protección.

Por otro lado un grupo de investigadores utilizaron otra porción de la subunidad pesada de 170kDa llamada LecA (578-1154 aa) que al aplicarse en combinación con el adyuvante EM014 (adyuvante) en ratones CBA/J retados con trofozoítos amibianos, resultó en una disminución significativa de la infección (Barroso *et al.*, 2014).

En la tabla 1 se muestra un resumen de los antígenos que más se han estudiados para el desarrollo de vacunas contra este parásito.

Tabla 1. Antígenos de *E. histolytica* probados en animales de experimentación

Antígenos	Modelo	Adyuvante	Vía de administración	Porcentaje de protección	Dosis μg	Referencia
SREHP	Gerbo	Freud	Intraperitoneal Intradérmica	100%	150	Zhang <i>et al.</i> , 1994.
29-kDa (Eh29)	Rata	CTB	Oral	80%	30	Soong <i>et al.</i> , 1995
Adhesina 112 kDa	Hámster	Freud	Subcutánea	33%	120	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004
EhCBP30	Hámster/ gerbo	Freud	Subcutánea	43%	30	González-Vázquez <i>et al.</i> , 2012
Gal-GalNac						
260-kDa	Gerbo	Freud	Intraperitoneal Subcutánea	86%	30	Petri y Ravdin, 1991
LecA	Rata	EM014	Subcutánea	89%	100	Barroso <i>et al.</i> , 2014
LC3	Hámster	*CTB Freud	Oral/nasal/ subcutánea	79%	-	Meneses-Ruíz <i>et al.</i> , 2011
**1-436	Rata/Gerbo	Freud	Intraperitoneal	8%	50	Lotter <i>et al.</i> , 1997
**436-624	Rata/Gerbo	Freud	Intraperitoneal	38%	50	
**799-939	Rata/Gerbo	Freud	Intraperitoneal	12%	50	
**939-1053	Rata/Gerbo	Freud	Intraperitoneal	63%	50	

*Subunidad B de la toxina del cólera

** Fragmentos de la subunidad pesada de 170 kDa

1.6 Estrategias para el desarrollo de Vacunas

En la actualidad las terapias antígeno específicas representan un enfoque atractivo para el tratamiento de muchas enfermedades, al parecer la capacidad de poder inducir respuestas específicas que pueden reconocer y eliminar patógenos extra e intracelulares así como de

poder reconocer células tumorales ha permitido desarrollar tecnologías novedosas que permitan mantener y mejorar estas respuestas (García *et al.*, 2012). En 2005, Liao y colaboradores desarrollaron una vacuna dirigida contra la proteína E7 del virus del papiloma humano (Meyers *et al.*, 1992; Jeckel *et al.*, 2002), la estrategia que este grupo utilizó fue la generación de una proteína de fusión ligada a dominios de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Jino *et al.*, 1989) y a una secuencia de aminoácidos conocida como KDEL (PE (Δ III)-E7-KDEL3), observaron que al utilizar esta proteína de fusión la respuesta inmunológica de antígenos específicos es mejorada significativamente, debido a que se aumenta el procesamiento antigénico por MHC I y II, el número de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ específicos también se ve incrementado y hay un marcado título de anticuerpos específicos. Se conoce que la función de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (66 kDa) (Boland *et al.*, 2013). Su mecanismo de acción ha sido muy estudiado debido a las amplias modificaciones que se pueden hacer para redirigir su potente citotoxicidad a una función terapéutica, cuando se combina con una variedad de elementos, tales como ligandos de receptores y fragmentos de anticuerpos, por lo cual PE se convierte en un agente selectivo que pueda ser utilizado para la eliminación de poblaciones de células específicas (Weldon y Pastan, 2011) y además para mejorar la presentación de antígenos (Goletz *et al.*, 1997).

La PE presenta diferentes dominios donde el dominio PE-I se une al receptor de superficie, el PE-II es responsable de la translocación de la toxina al citosol y PE-III promueve la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (Jinno *et al.*, 1989). Por otra parte se ha visto que la PE puede translocarse al retículo endoplásmico (RE), ya que presenta una secuencia adyacente a la porción C-terminal conocida como R⁶⁰⁹EDL⁶¹² (REDL) esencial para la citotoxicidad. La secuencia RDEL-C-terminal, es una variante de la secuencia KDEL (KDEL, secuencia de retención en el RE), la cual es reconocida por el receptor KDEL (KDEL-R) lo cual permite su reconocimiento y retención en el RE (Fominaya *et al.*, 1996; Fominaya *et al.*, 1998). KDEL es una secuencia de aminoácidos (Lys-Asp-Glu-Leu) ubicados en la región carboxi-terminal, es una señal para la retención de proteínas en el retículo endoplásmico (Weldon y Pastan, 2011). La secuencia KDEL es reconocido por un receptor unido a la membrana que recupera continuamente las proteínas de un compartimento posterior de la vía secretora y los devuelve al retículo endoplásmico (Pelham, 1990). A partir de estas técnicas de ADN recombinante para la producción de nuevas proteínas se han podido

obtener numerosos antígenos con características inmunogénicas deseables, las cuales pueden ser utilizadas con fines terapéuticos.

1.7 Sistemas de Expresión

A mediados de 1970 se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de DNA recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria biofarmacéutica actual. Mediante la tecnología de DNA recombinante ha sido posible modificar genéticamente diversos tipos de células que actúan como “reactores” biológicos, capaces de sintetizar moléculas con aplicaciones terapéuticas basados en proteínas recombinantes. Los hospederos procariontes y eucariotes son las dos categorías generales de los sistemas de expresión (Guzzo y Yang, 2007). *Escherichia coli* (*E. coli*) ha sido extensamente empleada como hospedero celular para la expresión de proteínas heterólogas. Sin embargo, aplicar este sistema a la producción de proteínas complejas derivadas de genomas eucariotes, que requieren modificaciones postraduccionales, ha sido problemático, dado que este microorganismo carece de la maquinaria intracelular que le permita realizar dichos procesos (Schmidt, 2004). Las levaduras presentan muchas ventajas en cuanto a crecimiento alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, pero además, como buenos eucariotes, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro. Otro aspecto en el que las levaduras se muestran como valiosos productores de proteínas recombinantes, es la disponibilidad de algunos promotores de fuertes y de regulación muy precisa, sobre todo en las levaduras metilótrofas, como *P. pastoris* (Ahmad *et al.*, 2014).

P. pastoris es una levadura metilótrófica capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono, crece a altas densidades celulares, provee una expresión finamente controlada y eficiente (Balamurugan *et al.*, 2007). Posee ciertas propiedades que justifican el éxito de su acrecentada utilización como sistema eucariote de expresión de proteínas heterólogas, realiza modificaciones post-traduccionales que se asemejan más a las de organismos eucariotes superiores, no hiperglicosila, es decir, la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los treinta residuos de manosa (Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Presenta un promotor fuerte (es decir, de elevado nivel de

transcripción) (Noseda *et al.* 2014) y altamente regulable (promotor AOX1: alcohol oxidasa). El gen AOX1 es el responsable de la síntesis del 90% de la alcohol oxidasa generada en la célula, mientras que el gen AOX2 codifica tan sólo el 10% restante (Cereghino y Cregg, 2000). Esta enzima se encarga de la oxidación del metanol por lo cual el empleo del metanol controla el nivel de transcripción de las proteínas que utilizan este sistema.

Las tecnologías recombinantes han hecho posible la producción de un amplio catálogo de proteínas de interés. Los esfuerzos para mejorar el desarrollo de nuevas estrategias ha aumentado notablemente en las últimas décadas, dichos esfuerzos se han enfocado en la prevención y la terapia, incluyendo la generación de vacunas y la modulación del sistema inmunológico. Esto ofrece la posibilidad de reducir el uso de medicamentos mediante el control de los procesos fisiológicos y mejorar la eficacia de la prevención de las infecciones. Así, hoy en día diferentes proteínas recombinantes con propiedades terapéuticas se han producido con éxito a través de procesos rentables utilizando células microbianas. Por lo cual el empleo de estas herramientas para el desarrollo de vacunas representa una alternativa atractiva. Las vacunas han demostrado ser una de las mejores estrategias de intervención en el sistema inmune para proteger al organismo en contra de la progresión de una amplia variedad de enfermedades a través de la inducción de una inmunidad protectora de larga duración (Zaman y Toth, 2013).

Como se mencionó anteriormente en el caso de la amibiasis no existe una vacuna, que se haya empleado para ensayos clínicos en humanos, los estudios sobre este parásito se enfocan en el empleo de proteínas con capacidad inmunogénica, por lo cual este trabajo tiene como objetivo la obtención de una vacuna eficaz contra la amibiasis empleando diferentes estrategias que nos permitan aumentar la respuesta inmune frente a la infección, evitando la co-aplicación de adyuvantes.



CAPÍTULO II

2. JUSTIFICACIÓN

E. histolytica es un protozoo parásito causante de la disentería y del absceso hepático amibiano. Es responsable de 50,000 a 100,000 muertes por año a nivel mundial (WHO, 1997). La enfermedad es mucho más frecuente en países en desarrollo debido al mal saneamiento, la falta de agua potable y la desnutrición (Mondal *et al.*, 2009). En México la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública, en el 2006 se estimó una tasa de morbilidad de entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes (Ximénez *et al.*, 2007). Los tratamientos farmacológicos son efectivos sin embargo, no se ha podido reducir los efectos secundarios causados durante su administración (Leitsch *et al.*, 2007). Por ello las vacunas han demostrado ser una de las mejores estrategias de intervención en el sistema inmune para proteger al organismo en contra de la progresión de una amplia variedad de enfermedades a través de la inducción de una inmunidad protectora de larga duración (Czerkinsky *et al.*, 2015). Las técnicas de biología molecular nos han permitido conocer aún más sobre la biología del parásito y con ello mejorar y desarrollar un conjunto de herramientas aplicadas a la fabricación de vacunas contra *E. histolytica* (Samuel y Stanley, 1997).

En este contexto se pretende realizar la producción de proteínas recombinantes de fusión que tengan la capacidad de generar una respuesta inmune eficaz contra *E. histolytica* utilizando la proteína LC3 como proteína inmunogénica para diseñar una posible vacuna contra ese parásito.



3. HIPÓTESIS

La proteína recombinantes LC3 fusionada a la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, generan una respuesta inmune protectora frente a la infección contra *E. histolytica*.





CAPÍTULO IV

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína recombinante LC3 fusionada a la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* y KDEL genera una respuesta inmune protectora frente a *Entamoeba histolytica*

4.1 Objetivos específicos

Diseñar genes de expresión y purificación de la proteína recombinante LC3 de *Entamoeba histolytica* fusionada a péptidos PE Δ III y KDEL.

Determinar si la administración de las proteínas recombinantes induce una respuesta inmune humoral y celular.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia general

Se generaron vectores de expresión pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3, los cuales fueron utilizados para la transformación de levaduras (*P. pastoris* GS115) para la producción de la proteína recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3. La producción fue determinada mediante SDS-PAGE, Dot-blot y Western-blot. La evaluación inmunológica de PE Δ III-LC3-KDEL3 se realizó a través de ELISA (Figura 7).

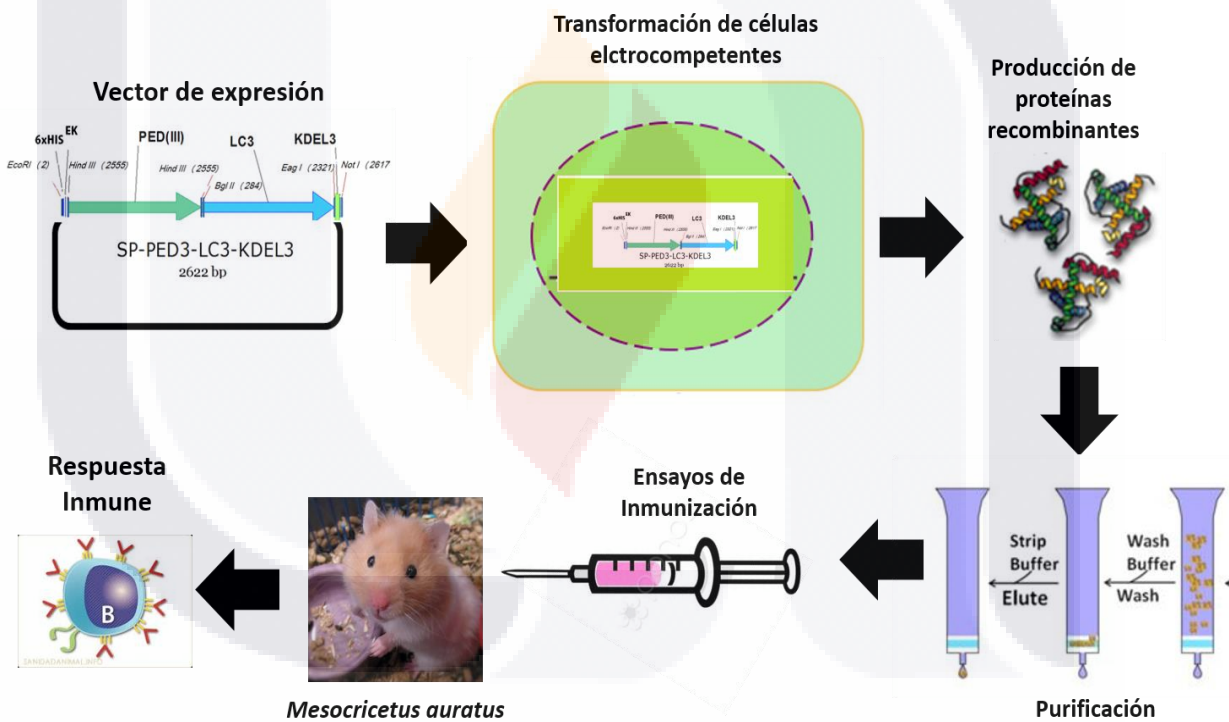


Figura 7. Estrategia general sobre el diseño, producción y evaluación del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3.

5.1.1 Diseño del gen de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3

Para el diseño del gen sintético PE Δ III-LC3-KDEL3, las secuencias nucleotídicas de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) con un número de acceso en el banco de genes (GenBank) K01397.1 y la del fragmento codificante LC3 (52 kDa) de la subunidad pesada de 170 kDa (Gal-GalNAc) con un número de acceso en el GenBank XP_656181, fueron obtenidas de la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI).

Una vez obtenidas cada una de las secuencias, estas fueron procesadas de la siguiente forma: La secuencia del fragmento LC3 se fusionó de forma individual a los dominios I-II de la secuencia del gen PE, con delección en el dominio III y a su vez ambas secuencias fueron fusionadas a la secuencia KKDEL-RDEL-KDEL (KDEL3) (Liao *et al.*, 2005). Además como parte del diseño se incluyeron los siguientes elementos que se muestran a continuación: *EcoRI*, marcador 6-Histidinas (6-His), sitio de corte con enterocinasas (Ek), *HindIII*, dominio I y II de PE deletada en el dominio III (PE Δ III), *HindIII*, *BglII*, LC3, *EagI*, KDEL3, codón de paro (UAA) y el sitio *NotI* al final de la secuencia (Figura 8).

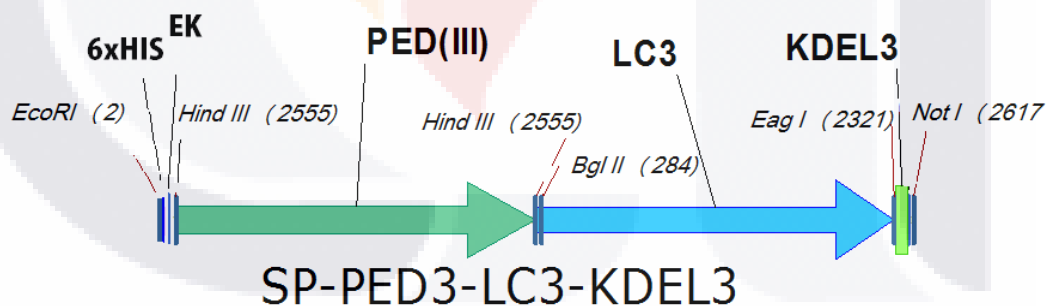


Figura 8. Diseño de la proteína de fusión PE Δ III-LC3-KDEL3

Una vez obtenido el diseño del gen PE Δ III-LC3-KDEL3 este fue enviado a sintetizar con optimización de codones por la empresa GenScript (GenScript Inc, Piscataway, NJ, USA), el gen sintético fue clonado en el vector pUC57 para generar pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3. El

cual nos permitió realizar las clonaciones pertinentes para la obtención del antígeno recombinante.

5.2 Construcción del vector de expresión pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3

Para la construcción del gen de expresión se empleó el vector pPIC9 el cual pertenece a un grupo de vectores utilizados para la transformación de levaduras como *P. pastoris*. Está compuesto por secuencias de DNA que contienen el promotor AOX1, seguido por un sitio múltiple de clonación (*Xho*I, *Sna*BI, *Eco*RI, *Avr*II, *Not*I), una secuencia de terminación de la transcripción del gen AOX1 (la cual propicia un procesamiento eficiente de la región 3' y la poliadenilación del RNAm) y una secuencia señal de secreción. Este vector también incluyen al gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) como marcador de selección, además de las secuencias requeridas para la replicación y mantenimiento en bacterias (ColE1, origen de replicación y Amp^r, gen de resistencia a ampicilina) (Cereghino y Cregg, 2000) (Figura 9).

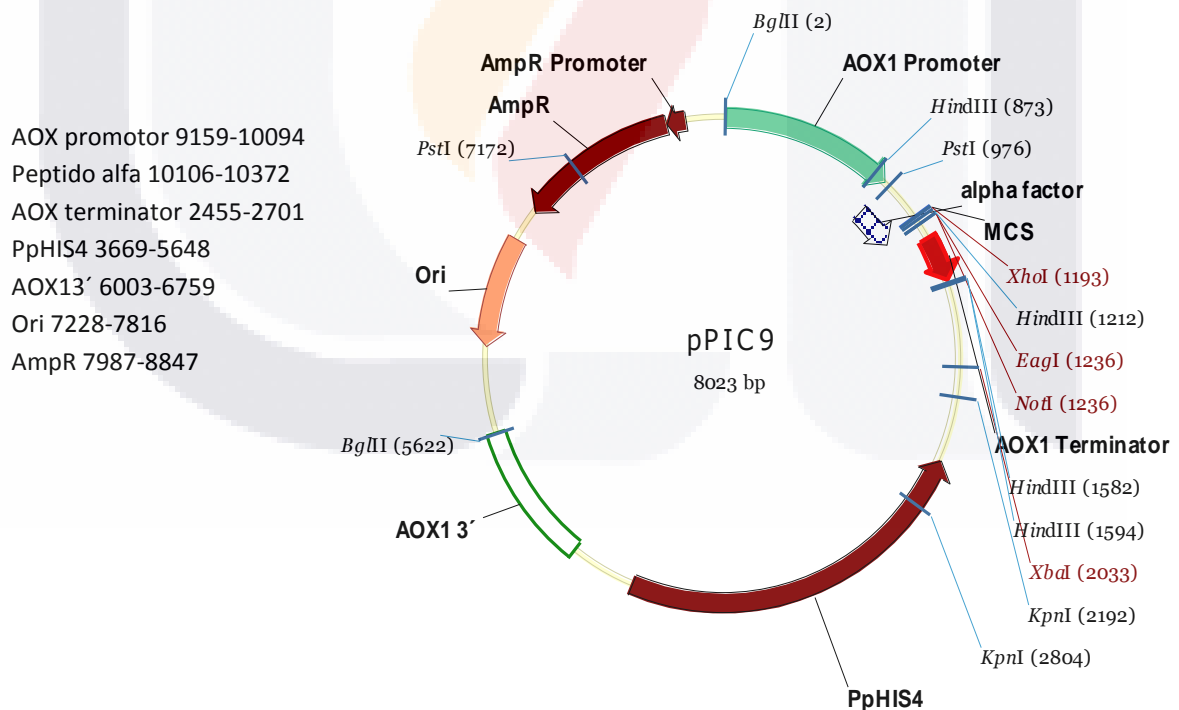


Figura 9. Vector de expresión pPIC9 para *P. pastoris*.

5.2.1 Digestión enzimática del pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3

Se llevó a cabo la digestión del fragmento correspondiente del pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3 mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (Promega, Madison, WI, USA). Se utilizaron los buffers recomendados por la casa comercial para cada una de las endonucleasas. Las reacciones de digestión se desarrollaron a 37°C durante 2 horas (h), o hasta 12 h en el caso de algunas reacciones que implicaban el uso de la enzima *NotI* (Promega).

5.2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La liberación del fragmento se comprobó mediante una electroforesis de agarosa al 0.8% o al 1% en función del tamaño esperado de los fragmentos a analizar. La suspensión de agarosa se preparó en buffer TAE 1X; (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

La separación electroforética se realizó con un voltaje constante (100 Volts). El gel fue revelado utilizando una solución de Bromuro de etidio (BrEt) en agua destilada durante 5 minutos, posteriormente este fue lavado en agua destilada durante 30 segundos y, la visualización de las bandas se realizó mediante la exposición a luz ultravioleta en un transiluminador conectado a un sistema de captura e impresión de imágenes. Cabe mencionar que todas las electroforesis en agarosa fueron realizadas de la misma manera.

5.2.3 Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa se realizó utilizando el kit comercial The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) diseñado para extraer y purificar fragmentos de entre 100 pb y 10 kb. La banda de interés se procesó siguiendo las especificaciones del proveedor. Las muestras obtenidas se eluyeron con agua libre de nucleasas en un volumen final de 30 μ l.

5.2.4 Ligación del fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3 en pPIC9

La ligación del fragmento purificado en el vector pPIC9 se realizó en los mismos sitios de restricción. Para la reacción de ligación se emplearon los buffers y enzimas descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Reacción utilizada para la clonación de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el vector pPIC9.

Buffer 10X	1 μ l
Vector (pPIC9)	3 μ l (50 ng)
Inserto (fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3)	7 μ l (100 ng)
Ligasa (T4 ADN Ligasa)	1 μ l (0.1 a 1u)
Agua libre de nucleasas	3 μ l

5.2.5 Transformación bacteriana por choque térmico

La transformación se realizó utilizando células de *E. coli* DH5- α o TOP 10 competentes, donde el estado de competencia se generó siguiendo el método de cloruro de calcio descrito por Sambrook *et al.*, 1989 (Anexo C1).

Para la transformación de las células competentes por choque térmico se realizó el siguiente protocolo: se utilizaron de 100 a 200 ng del producto de ligación correspondiente, el cual fue añadido a un tubo con 50 μ l de células calcio competentes, la células se incubaron en hielo durante 1 h después fueron sometidas a cambios de temperatura: 42°C por 1 min, incubación en hielo 2 min, después se añadió 1 ml de medio LB líquido y se incubaron a 37°C durante 45 min con agitación. Posteriormente las bacterias se sembraron en cajas con medio sólido LB suplementado con (100 μ g/ml) ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche.

5.2.6 Extracción de ADN plasmídico

Las células fueron crecidas en LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Una vez obtenido el cultivo de cada colonia, se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el protocolo propuesto por Birnboim y Doly (1979), el cual consiste en la extracción de los plásmidos con un método alcalino (Anexo C.4).

5.2.7 PCR para la caracterización de PE Δ III-LC3-KDEL3

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en volúmenes de 10 µl, en tubos eppendorf de 0,2 ml de capacidad. Las mezclas de reacción consistieron en: 1 µl de buffer 10X (Tris HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM), 1 µl de MgCl₂ a una concentración de 2.5 mM, 0.6 µl de la mezcla de dNTPs (0.25 mM), 1.6 µl de cebadores (0.1 a 1 µM) y entre 1 y 1.25 U (unidades) de ADN polimerasa. Las cantidades de ADN fueron aproximadamente de 100-200 ng de ADN plasmídico. Para la amplificación de la PCR se utilizaron los siguientes cebadores específicos del fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3 descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para el fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3

FW	RV
	R-KDEL3
F-PE Δ III 5'-AGATGTAACCTTGATGAC-3	5'CTCGAGTTACAGCTCGTCCTTTTACTC-3
F-PE Δ III 5'-AGATGTAACCTTGATGAC-3	R- LC3 5'-GTTGACAGTCGAAGTTTG
F-LC3- 5'-ACGACATCTGTGCCGAATG-3	R- LC3 5'-GTTGACAGTCGAAGTTTG

Las condiciones utilizadas para la amplificación se muestran a continuación: 1 ciclo de 94°C por 3 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 55°C por 1.5 min (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión); por último una extensión final de 1 ciclo a 72°C por 5 min (extensión final). Se utilizó un termociclador Eppendorf® Mastercycler.

Las muestras amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

5.2.8 Caracterización por digestión enzimática de PE Δ III-LC3-KDEL3

La digestión enzimática se realizó con las enzimas *Pst*I y *Hind*III (Promega). Se utilizaron los buffers recomendados por la casa comercial para cada una de las endonucleasas. La reacción de digestión se desarrolló a 37°C durante 2 h. Las muestras digeridas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

5.2.9 Secuenciación de los genes de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3

Para comprobar la integridad de la secuencia de la construcción se llevó a cabo la secuenciación de los plásmidos empleando los oligonucleótidos comerciales F-5'AOX1 (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) y R-3'AOX1 (GCAAATGGCATTCTGACATCC). Estas fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). Las secuencias obtenidas fueron analizadas bioinformáticamente utilizando el programa ClustalW.

5.3 Transformación de *Pichia pastoris*-GS115

Para facilitar los fenómenos de recombinación entre regiones homólogas existentes en el vector y en el DNA genómico de las levaduras, el vector empleado para la transformación de la cepa de *P. pastoris* fue linearizado mediante digestión enzimática con la enzima *Nsi*I (Promega). Las muestras linearizadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

5.3.1 Transformación de levaduras por electroporación.

Se transformaron células competentes de *P. pastoris* GS115, las células fueron previamente preparadas siguiendo el protocolo descrito en el anexo C.2.

Para la transformación se determinaron las concentraciones del ADN plásmidico con el espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) y se electroporaron de 3 a 6 μg de ADN de la construcción linearizada, las condiciones empleadas fueron 400 Ω , 25 μF y 1,5 kV en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad, CA, EE.UU) en 80 μl de células de electrocompetentes. Inmediatamente finalizada la electroporación, se añadió 1 ml de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 2% dextrosa) y se incubaron a 30°C durante 1 h en agitación. Una vez llevado a cabo esto, las células transformadas fueron cultivadas en un medio selectivo sólido (MD: 1.34% YNB, 2% dextrosa, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de biotina y 2% de agar) a 28-30°C durante 3-4 días o hasta observar el crecimiento de las colonias.

5.3.2 Extracción de DNA total

Se colocaron clonas recombinantes de *P. pastoris* en medio YPD estas fueron incubadas durante 24 h a 30°C, una vez obtenido crecimiento se tomaron 2 ml de medio con levadura de cada muestra se centrifugaron 1 min a 12000 g y se eliminó el sobrenadante, se agregaron 200 μl de TSNT (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA pH 8 1 mM) y se mezcló en vortex 30 segundos, posteriormente se agregaron 400 μl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló en vortex 30 segundos, después se le agregaron 300 μl de TE 1X (EDTA 100mM, Tris-HCl 1M) se agito por inversión y se centrifugó 7 min a 12,000 g, se recuperó la fase acuosa la cual se precipitó adicionándole 2.5 volúmenes de etanol absoluto frio y fue nuevamente centrifugado durante 10 minutos a 12000 g. Una vez finalizado se descartó el sobrenadante y se agregaron 700 μl de etanol al 70% frio, se centrifugó 10 minutos a 12000 g y se decantó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 30 μl de agua libre de nucleasas.

5.3.3 PCR para el análisis de integración de PE Δ III-LC3-KDEL3 al genoma de *P. pastoris*

A fin de verificar la presencia del vector de expresión en el genoma de la levadura, se llevó a cabo el análisis de integración de pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. A partir de las clonas obtenidas se realizó la extracción de DNA genómico por el método TSNT (ver anexo C.5).

Las clonas transformadas se identificaron por PCR.

Los oligonucleótidos utilizados fueron: F-AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y R-AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3').

Las condiciones utilizadas para la amplificación se muestran a continuación: 1 ciclo de 94°C por 5 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 50°C por 1 min (alineamiento) y 72°C por 3 min (extensión); por último una extensión final de 72°C por 5 min. Se utilizó un termociclador Eppendorf® Mastercycler. Las muestras amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

5.4 Ensayos de expresión y purificación de la proteína recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 en *P. pastoris*

5.4.1 Inducción a nivel matraz

Las clonas positivas (GS115-PE Δ III-LC3-KDEL3) se inocularon en 50 ml de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 2% dextrosa) a 28°C y se incubaron durante 24 h a 250 rpm de agitación. Posteriormente las células se reinocularon en 10 ml de un medio con glicerol (BMGY: 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% base nitrogenada de levadura, 0.4 μ g/mL biotina, 1% glicerol). Después de 24 h de crecimiento a 29°C con agitación, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 3220 g, el sobrenadante se desechó y las células fueron lavadas con agua destilada estéril y nuevamente se centrifugaron. Las células se resuspendieron en 50 ml de medio complejo con metanol (BMMY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1,34% de base nitrogenada de levadura, 0.4 μ g/mL de biotina, 0,5% de metanol). La expresión de las proteínas recombinantes se realizó durante 24 h a 29°C con agitación vigorosa. Después de la inducción el sobrenadante se obtuvo por centrifugación del cultivo celular durante 15 minutos a 3220 g. El sobrenadante fue almacenado a -20°C para su posterior análisis.

5.4.2 Análisis de proteínas en medio de cultivo (nivel matraz)

5.4.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las concentraciones de las proteínas fue determinada del sobrenadante usando el método de Bradford (Bradford et al., 1976). Para ello se procedió a realizar una curva estándar con albumina sérica bovina (BSA) (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml). Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 595 nm con un espectrofotómetro Beckman (Du 530).

5.4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes

Para el análisis en SDS-PAGE de proteínas secretadas se tomó 1 ml de medio de cultivo el cual fue precipitado con ácido tricloroacético (TCA) o acetona, siguiendo el protocolo descrito por Santana *et al.*, 2016 y se resuspendió en 25 µl de Tris-base 1 M y 25 µl buffer de muestra (Sample-buffer-SDS-PAGE: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). Las proteínas precipitadas fueron separados en un gel de poliacrilamida (Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, Tris HCl 1.5 M pH de 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio (APS) al 10%, y N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0.05%) al 12% durante 2 h a 100 V.

5.4.2.2.1 Tinción de geles de poliacrilamida

5.4.2.2.1.1 Tinción con nitrato de plata

Para la tinción con nitrato de plata el gel fue previamente fijado con una solución de metanol, ácido acético y agua (45% de metanol, 10% de ácido acético) durante 24 h, posteriormente se colocó en una solución de etanol-ácido acético (10% etanol y 5% ácido acético) durante 30 minutos en agitación. Trascurrido este tiempo se lavó con agua destilado durante 30 minutos en agitación constante. El gel fue sumergido en una solución de ditiotretitol (0.0015%) durante 30 min. Pasado este tiempo se lavó con agua destilada y se tiñó con una solución de nitrato de plata (0.2% en agua desionizada) durante 30 minutos. Después de la tinción se realizó un lavado con agua desionizada y se reveló con una solución de

carbonato de sodio (3%) y formaldehído (0.05%). Una vez observadas las bandas se detuvo la reacción con ácido acético (1%).

5.4.2.3 Identificación de proteínas por Dot-blot

Se emplearon tiras de nitrocelulosa (Bio-Rad) las cuales fueron impregnadas con 30 µg de proteína encontrada en el sobrenadante. La membrana se incubó en BSA 5% (Tris-HCl 1 M a pH 7.4, NaCl, 25 mM, Tween 20-0.05%, BSA-5%) a temperatura ambiente durante 1 h, después se lavó con TBS-T (Tris-HCl 1 M a pH 7.4, NaCl 25 mM, Tween 20-0.05%) tres veces durante 10 minutos. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios respectivos durante toda la noche a 4°C y en agitación. Una vez terminada la incubación se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Las membranas se revelaron con 3,3'-Diaminobenzidina. Los anticuerpos empleados y las diluciones realizadas para esta técnica se describen en la tabla 5.

5.5 Escalamiento de PE Δ III-LC3-KDEL3 en biorreactor de tanque agitado.

Para llevar a cabo la inducción en un fermentador de tipo tanque agitado (Glass autoclavable biorreactor, Applikon biotech) de 3 L de volumen primero se obtuvo un preinoculo sembrando en 200 ml de medio YPG (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 2% glicerol) con el clon recombinante, incubándolo a 30°C, con agitación (250 rpm) durante 24-48 horas. Una vez obtenido el preinoculo se prepararon 1.8 L de medio definido FM22 (ver anexo A.2.6) y se esterilizó a 121°C por 20 minutos, después de enfriar y antes de la inoculación se adicionaron 0.2 g/L de biotina previamente esterilizado mediante filtración, el pH (5.5), fue regulado con NH₄OH al 28% estéril, se ajustó el sensor de oxígeno disuelto (DO) a 100% de saturación con aire atmosférico comprimido. Se realizó la adición del inoculo y se fijó un valor de DO mínimo de 25% (definido como *Set-point* (SP)), se dejó transcurrir el crecimiento del inoculo hasta observar incremento del oxígeno disuelto por encima del SP, indicando el agotamiento de glicerol en el medio de cultivo a partir aquí se inició con la tapa de inducción. La etapa de inducción se realizó con la adición de metanol (régimen lote alimentado o *fed- batch*) para ello se estableció un pulso de metanol a una concentración 0.05% v/v (metanol con 5 ml/L de sales PMT4), la adición de metanol fue

establecida dependiendo del DO (DO>SP se adicionó metanol, cuando DO<SP no se adicionó metanol). La adición de antiespumante se realizó de manera manual cuando fue requerida, además se realizaron muestreos del cultivo cada 8 h. En la tabla 4 se muestran las condiciones establecidas durante la fermentación.

Tabla 4: Condiciones establecidas durante la fermentación. Temp: temperatura, TFerm: tiempo de fermentación, TFin: tiempo final de fermentación.

Condiciones	
Temp	30°C
pH	5.5 (± 0.1)
DO	30% (SP)
CH ₃ OH	200 ml
TFerm	100 h
TFin	100 h

5.5.1 Análisis de proteínas en medio de cultivo a partir del escalamiento en biorreactor

Una vez terminado el proceso de fermentación, el caldo (1.5 L) fue clarificado, y concentrado en un volumen de 10 ml utilizando un ultrafiltrador (Amicon® Stirred Ultrafiltration Cells) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

5.5.1.2 Diálisis de proteínas

Para la eliminación de sales y otros elementos, las proteínas fueron dializadas utilizando membranas de diálisis con un punto de corte de 14 kDa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). El buffer de diálisis consistió en Tris-base 1 M pH 8.0 preparado para un volumen de 1 L, el tiempo de diálisis fue durante toda la noche a 4°C.

5.5.1.3 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

La purificación de las proteínas se realizó utilizando el kit ProBond™ Purification System (Thermo Fischer Scientific) el cual se basa en una cromatografía de afinidad en suspensión, especificada en la unión de proteínas a una resina que presenta níquel acoplado el cual reconoce proteínas recombinantes que contienen una secuencia de polihistidina (6-His). La resina es capaz de retener de 1-5 mg de proteína. La purificación se realizó siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor.

Las proteínas purificadas fueron separadas nuevamente por electroforesis en geles de poliacrilamida descrito en el apartado 5.4.2.2 y teñidas con nitrato de plata (apartado 5.4.2.2.1.1).

5.5.1.4 Identificación de glicosilaciones en PE Δ III-LC3-KDEL3

5.5.1.4.1 Tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff)

Se colocó el gel en una solución de etanol al 50% v/v durante 30 min en agitación constante. Se lavó varias veces con agua destilada hasta asegurarse que estuviera libre de etanol. Posteriormente se incubó en una solución de ácido per yódico al 1% v/v preparada en ácido acético al 3% por 30 minutos, se realizaron varios lavados con agua destilada y un lavado más durante toda la noche. Una vez concluido en lavado el gel fue colocado en una solución de metabisulfito de sodio al 0.1% con ácido clorhídrico a 10 mM, este proceso se realizó dos veces por 10 min. Al término se incubó con el reactivo de Schiff (1 g de Fuchina básica en HCl 1 M, 1 g de metabisulfito de potasio tratados con 2 g de carbón activado, durante 1 minuto) durante una hora en la oscuridad. Para desteñir el gel se utilizó una solución de ácido per yódico al 1% v/v preparada en ácido acético al 3% revisando el gel cada 15 min hasta obtener la tinción deseada.

5.5.1.5 Inmunodetección de proteínas: Western-blot para PE Δ III-LC3-KDEL3

5.5.1.5.1 Electroforesis

Se realizó una separación electroforética de las proteínas presentes en el medio de cultivo el gel se preparó en las mismas condiciones que se describen en el apartado 5.4.2.2. Una vez finalizada se realizó la transferencia de las proteínas.

5.5.1.5.2 Transferencia

Las muestras separadas electroforéticamente en SDS-PAGE fueron transferidas, para ello se utilizó un sistema de transferencia húmeda (Bio-Rad) empleando como buffer de transferencia una solución constituida por: Tris-base 250 mM, glicina 1.92 M, metanol al 20% v/v. Las membranas empleadas fueron membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF: Sequi-BlotTM 0,2 μ m (Bio-Rad) las cuales fueron previamente activadas en metanol durante 5 minutos y posteriormente lavadas en buffer de transferencia durante 5 minutos. La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante una hora a 100 Volts, las membranas ya transferidas se lavaron con TBS-T (Tris-HCl 1 M, a pH 7.4, NaCl 25 Mm, Tween-20-0.05%) para posteriormente realizar la inmunodetección

5.5.1.5.3 Inmunodetección

Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C con BSA al 5% (Tris-HCl 1 M, a pH 7.4, NaCl 25 Mm, Tween-20-0.05%, BSA 5%). Una vez concluido el bloqueo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA al 5% y TBS-T, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Una vez terminada la incubación se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron nuevamente con TBS-T 3 veces durante 10 minutos. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario (Tabla 1) durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Las membranas se revelaron con 3,3'-Diaminobenzidina. Los anticuerpos y las diluciones empleadas en esta técnica se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas

Anticuerpo primario	Epítotope	Dilución	No catalogo	Casa comercial
anti- <i>E. histolytica</i>	Pool de proteínas	1:1000	Fabricado en el laboratorio de Morfología	Ventura <i>et al.</i> , 2002
anti-6X His-HRP	6-His	1:5000	Ab18184	Abcam
Anticuerpo secundario	Epítotope	Dilución	No catalogo	Casa comercial
Anti-IgG-HRP	IgG	1:1000	Ab48386	Abcam

5.6 Ensayos de para detectar actividad biológica de PE Δ III-LC3-KDEL3

5.6.1 Animales de experimentación

Se obtuvieron hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*) de 80-100 g del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12:12) y se alimentaron con Purina Roedor Chow (Compañía Ralston Purina) y agua del grifo ad libitum. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Comité Institucional de Bioética y siguiendo la norma oficial mexicana NOM-062-Z00-1999 para el cuidado de animales experimentales.

5.6.2 Ensayos de inmunización

Los animales de experimentación fueron divididos en 4 grupos: grupo vehículo (n=5), grupo 30 (n=5), grupo 50 (n=5) y grupo 100 (n=5). Antes de las inmunizaciones, los animales recibieron vía oral antibiótico y desparasitante (0.1 gr de sulfato de neomicina y 1 gr de sulfadimetilpirimidina por litro de agua) durante 5. Para los ensayos de inmunización se siguió el protocolo reportado por González-Vázquez *et al.*, 2012 con algunas modificaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamiento. En la siguiente tabla se muestran los días, las dosis y la vía de inmunización que se emplearon durante las inmunizaciones.

Antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3		
Animales de experimentación (n=5)	Tratamiento	Vía de administración
Grupo vehículo	PBS 100 μ l/ animal	Subcutánea
Grupo 30	30 μ g/animal	
Grupo 50	50 μ g/animal	
Grupo 100	100 μ g/animal	

La administración del antígeno P Δ III-LC3-KDEL3 se realizó de forma subcutánea los días 0, 7, 14, y después de siete días a partir del último día de inmunización se realizó el sangrado para la obtención del suero inmune (Figura 10). El sagrado se llevó a cabo a través la punción de la vena yugular izquierda situada a un lado de la región cervical anterior en el cuello. Un volumen de 300 μ l de sangre fue obtenida de cada animal, las muestras se centrifugaron a 3 000 g durante 5 minutos y el suero fue almacenado a -20°C.

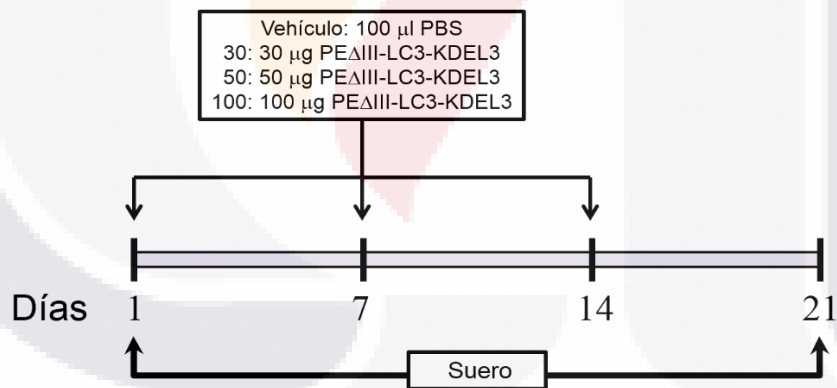


Figura 10: Esquema de inmunización. En la imagen se muestran los días de la administración del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 recombinante a diferentes concentraciones.

5.6.3 Detección de anticuerpos específicos PE Δ III-LC3-KDEL3 por ELISA.

El método ELISA se realizó para identificar los anticuerpos específicos producidos en animales inmunizados siguiendo el protocolo descrito por Vaz *et al.*, 2015, con algunas

modificaciones. Se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano con 100 μ l del antígeno PEDIII-LC3-KDEL3 a una concentración de 4 mg/ml, o 100 μ l del antígeno amibiano total a una concentración de 80 mg/ml (Ventura-Juárez *et al*, 2002) ambos preparados en buffer de carbonatos (0.032 M Na_2CO_3 , 0.068 M NaHCO_3 , pH 9.6). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween 0,025%. Cada pocillo de la placa se bloqueó con PBS 1X-Tween 0,025% que contenía albúmina de sérica bovina (BSA) al 1% durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados, el suero preinmune se diluyó (1: 5000) y se añadió a cada pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween 0,025%. A continuación, se añadió a cada pocillo la proteína biotilada recombinante G (Pierce) diluida a 1: 2000 durante 1 h. El material no unido se eliminó mediante lavados. Para el desarrollo de la reacción, se incubó con un conjugado de avidina-peroxidasa (Thermo Fisher Scientific) diluido 1: 2000 a temperatura ambiente durante 1 h. La densidad óptica (DO) se leyó a 490 nm en un lector de ELISA (iMark Microplate-Reader, BioRad). Los ensayos se realizaron por triplicado y los valores de DO_{490} se promediaron.

5.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism V5. Los datos se expresan como la media de cinco animales por grupo y triplicados de cada uno \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA unidireccional seguido por la prueba Turkey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.



CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1.1 Diseño del antígeno recombinante de fusión PE Δ III-LC3-KDEL3

El propósito de este estudio fue diseñar, construir y producir una proteína recombinante a partir del fragmento LC3 de *E. histolytica* fusionada a secuencias adicionales como la PE Δ III y KDEL3 para su evaluación como vacuna potencial contra *E. histolytica*. El desafío de desarrollar vacunas eficaces contra la amibiasis requiere de la aplicación de nuevas metodologías capaces de generar eficientemente proteínas amibianas con características inmunogénicas.

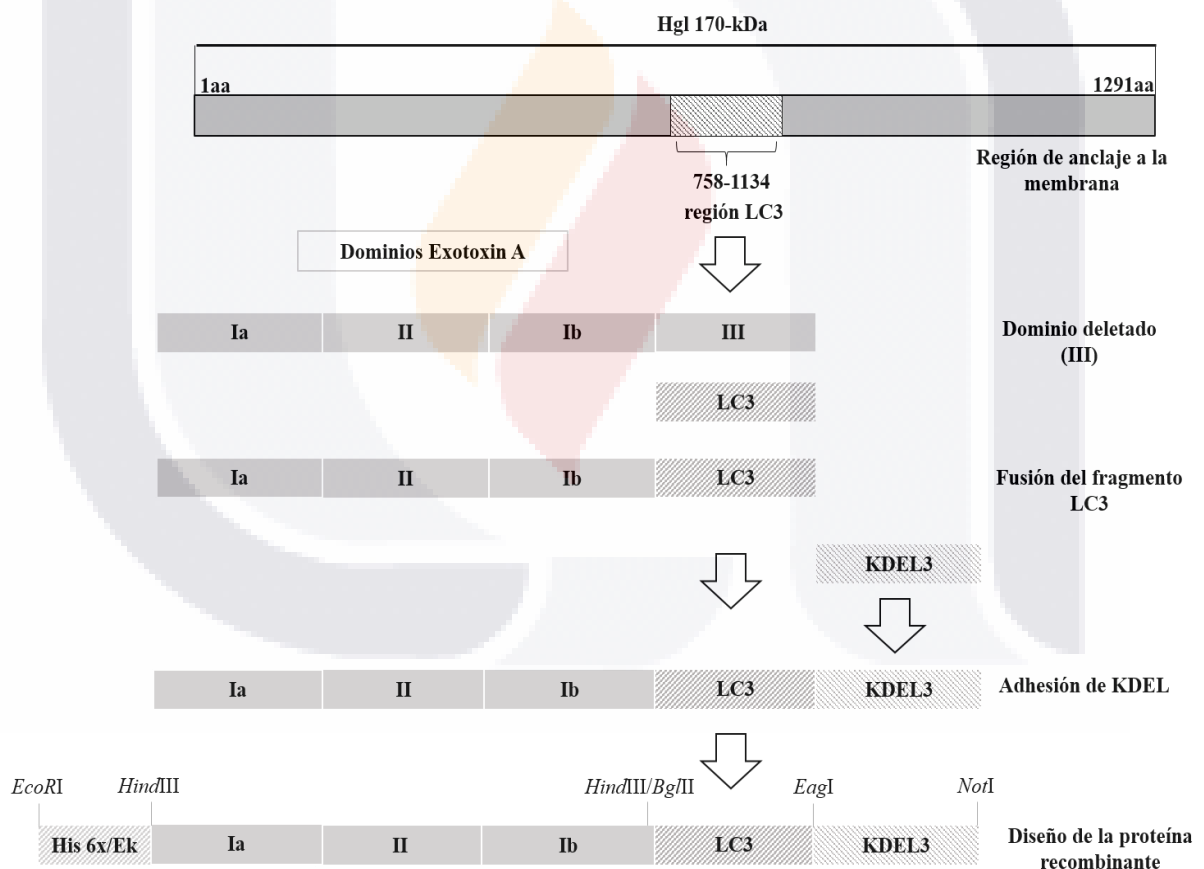


Figura 11. Diseño de la proteína recombinante de fusión PE Δ III-LC3-KDEL3.

Para esta finalidad se seleccionó el fragmento LC3 (Soong *et al.*, 1995) de la subunidad pesada de 170 kDa de la lectina de 260 kDa fusionada a los dominios I, II de la exotoxina

A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) (deletada en el dominio III: PE Δ III) y la secuencia del péptido KDEL3 (Figura 11). La secuencia que codifica la región del fragmento LC3 se encuentra entre el aminoácido 758 al 1134 y está conformada por un total de 268 aminoácidos. La secuencia génica del pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3 con optimización de codones fue subida al banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) con el número de acceso asignado KY657281.

6.1.2 Clonación de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el vector pPIC9

Para la expresión de las proteínas de fusión en *P. pastoris* se empleó el vector pPIC9, en ambos casos tanto para el vector como para la liberación del gen de interés se realizó una doble digestión enzimática, donde se obtuvo un fragmento de 2 375 pb correspondiente a PE Δ III-LC3-KDEL3, el cual una vez purificado, se ligó a pPIC9. En la figura 12 se puede observar la doble digestión enzimática realizada para la obtención del fragmento de interés. Además se puede observar la ligación del fragmento purificado con el vector pPIC9 (Figura 13).

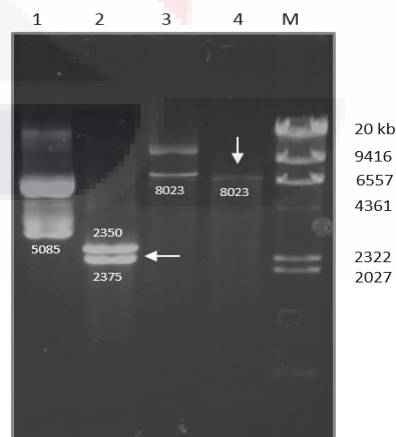


Figura 12. Digestión enzimática de PE Δ III-LC3-KDEL3 y linealización de pPIC9. Carriles: (1) plásmido pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3; (2) doble digestión del pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3 con *EcoRI* y *NotI*: fragmento de 2735 pb; (3) vector pPIC9; (4) pPIC9 (*EcoRI* y *NotI*); (M) Marcador de peso

molecular (*Lambda-HindIII*). Gel de agarosa al 0.8 %, teñido con Bromuro de etidio y observado con luz ultravioleta (312 nm UV-B).

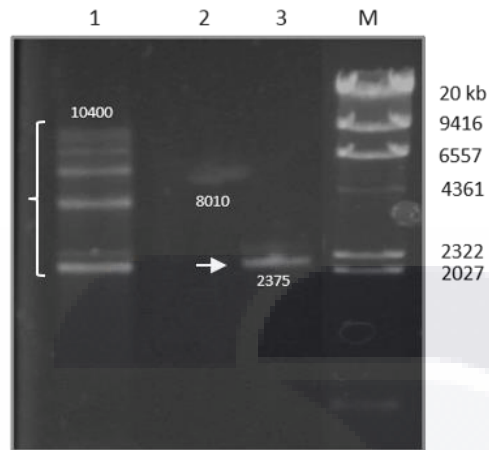


Figura 13. Construcción del vector pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. Carriles: (1) Producto de la ligación de PE Δ III-LC3-KDEL3 con pPIC9; (2) vector pPIC9 abierto con *EcoRI* y *NotI*; (3) fragmento purificado de 2 375 pb (PE Δ III-LC3-KDEL3); (M) Marcador de peso molecular *Lambda/HindIII*. Gel de agarosa al 0.8 %, teñido con Bromuro de etidio y observado con luz ultravioleta (312 nm (UV-B).

6.1.3 Amplificación por PCR del gen de expresión PE Δ III-LC3-KDEL3 en pPIC9

A fin de determinar la correcta clonación en el vector del fragmento PE Δ III-LC3-KDEL3 se realizó una caracterización por PCR y digestión enzimática. El Producto de PCR obtenido a partir de la extracción de ADN plasmídico de las clonas transformadas (pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3) confirma la presencia de cada segmento que conforma parte del gen de interés (PE Δ III-LC3-KDEL3).

Las amplificaciones se realizaron con los oligonucleótidos específicos para cada región. Los productos de amplificación de cada segmento del gen fueron de 1 692 pb (PE Δ III-LC3-KDEL3), 1 120 pb (PE Δ III-LC3), 1 172 pb (LC3-KDEL3) y 600 pb (LC3) respectivamente (Figura 14).

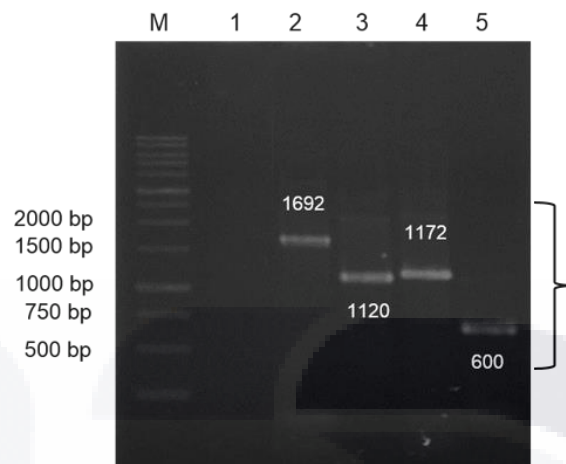


Figura 14. Caracterización por PCR de la construcción pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos específicos para cada región del gen PE Δ III-LC3-KDEL3. Carriles: (M) Marcador de peso molecular (1 kb); (2) PE Δ III-LC3-KDEL3 de 1 692 pb; (3) fragmento PE Δ III-LC3 de 1 120 pb; (4) fragmento LC3-KDEL3 de 1 172 pb; (5) fragmento LC3 de 600 pb. Gel de agarosa al 0.8 %, teñido con Bromuro de etidio y observado con luz ultravioleta (312 nm (UV-B)).

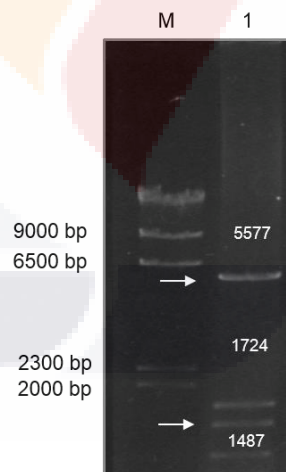


Figura 15. Caracterización enzimática de pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. Fragmentos liberados a partir de la digestión enzimática de la construcción pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. Carriles: (M) marcador de peso molecular (*Lambda-HindIII*); (1) fragmentos obtenidos de 5 577, 1 724 y 1 487 pb. Gel de agarosa al 0.8 %, teñido con Bromuro de Etidio y observado con luz ultravioleta (312 nm (UV-B)).

En lo que respecta a la caracterización por el método enzimático, se emplearon las enzimas *Pst*I y *Hind*III. Los fragmentos liberados a partir de la digestión enzimática fueron de 5 577 pb, 1 724 pb y 1 487 pb, los cuales fueron comparados con los patrones de restricción predichos del análisis *“in silico”*, empleando el programa *Nebcutter V. 2.0* (New England Biolabs). Esto nos confirma la clonación de PEΔIII-LC3-KDEL3 en el vector pPIC9. (Figura 15)

6.1.4 Comprobación de la integridad de PEΔIII-LC3-KDEL3 por secuenciación

Como se mencionó en la sección 5.2.9 la construcción fue secuenciada con los cebadores 5'AXO1 y 3'AOX1. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un alineamiento múltiple de nucleótidos en el programa *ClustalW* (Instituto Europeo de bioinformática). Las secuencias analizadas fueron las reportadas a partir de la síntesis del gen y las secuencias obtenidas después de la clonación en el vector pPIC9 (reportadas por LANGEBIO). Los resultados que arroja el análisis bioinformático muestra una igualdad (alta) de secuencias nucleotídicas, lo cual nos indica que durante la construcción no hubo modificaciones que pudieran cambiar el marco de lectura de la proteína esperada, además el alineamiento permitió identificar cada una de las regiones que forman parte del gen de expresión, las cuales corresponden a la región PEΔIII, LC3 y KDEL3 (Figura 16).

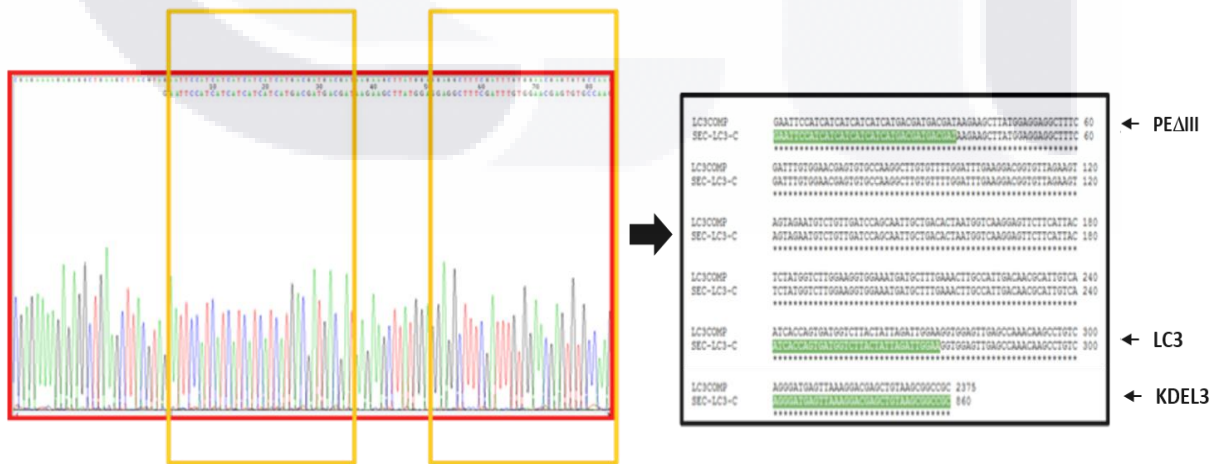


Figura 16. Secuenciación de PEΔIII-LC3-KDEL3

6.2 Integración de PE Δ III-LC3-KDEL3 en el genoma de *P. pastoris*

Las clonas recombinantes obtenidas posteriores a la transformación fueron analizadas mediante PCR empleando los iniciadores AOX1, los cuales flanquean la región en el vector donde se inserta el fragmento de interés, el producto de amplificación fue de 2 848 pb. En la figura 17 se muestra el resultado obtenido del análisis.

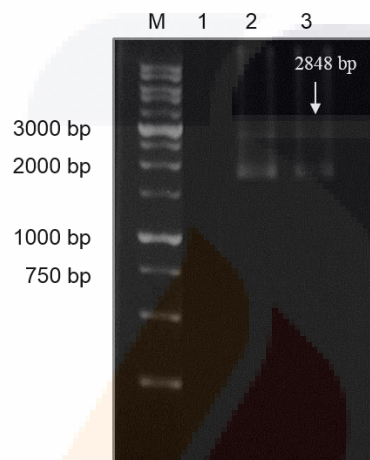


Figura 17. Análisis integración genómica de pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 en *P. pastoris*. El producto de amplificación obtenido a partir del análisis de PCR fue de 2 848 pb, este se realizó a partir de ADN genómico de clonas transformados de *P. pastoris*. Carriles: (M) Marcador de peso molecular (1 kb); (1) control negativo; (2-3) Clones recombinantes con el gen PE Δ III-LC3-KDEL3.

6.3 Expresión, purificación, y caracterización del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3

6.3.1 Producción a nivel matraz

La expresión de proteínas recombinantes en el sistema basado en la levadura *P. pastoris*, bajo el promotor del gen AOX1 inducible por metanol, se diseñó siguiendo la característica de expresión de la proteína PE Δ III-LC3-KDEL3 como proteína de secreción. Para ello se empleó el vector pPIC9, en donde la proteína quedaría fusionada a la señal de secreción del factor α en el extremo N-terminal permitiéndonos detectar la proteína en el medio de cultivo. La expresión se realizó en 2 clonas recombinantes cultivadas en matraces de 50

ml. Esta se realizó en varias fases: fase de crecimiento o producción de biomasa y fase de inducción. Las inducciones se realizaron en medio BMMY, donde se establecieron concentraciones de metanol de 0.5%. El análisis de las proteínas se realizó directamente del medio de cultivo y el análisis de proteínas se realizó a las 24 h posteriores a la inducción. Tras el análisis en SDS-PAGE del sobrenadante, se detectó la presencia de proteínas a las 24 h de inducción. La banda identificada en el gel fue de unos 67 kDa aproximadamente. En la figura 18 se muestra el gel donde se aprecia la expresión de la proteína en clones diferentes.

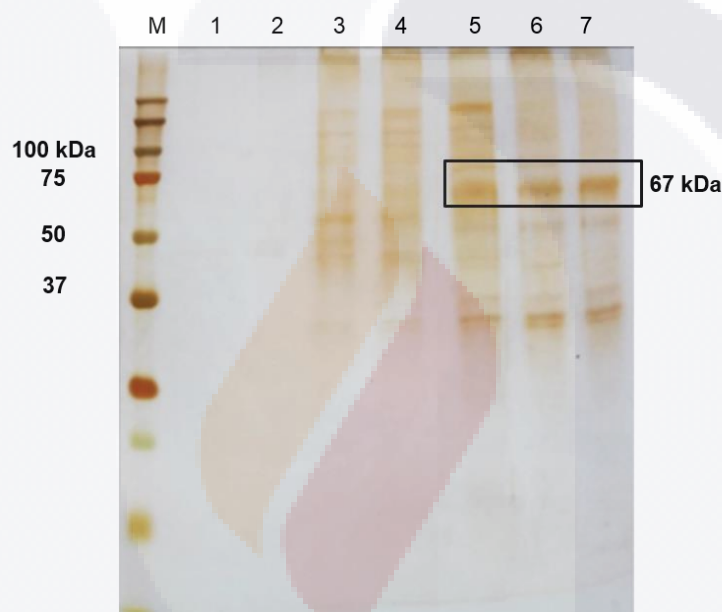


Figura 18. Ensayos de expresión a nivel matraz de clones recombinantes GS115-PE Δ III-LC3-KDEL3. La imagen muestra la expresión de las proteínas a las 24 h de inducción. SDS-PAGE al 12% teñido con nitrato de plata. Carriles: (M) Marcador de peso molecular; (2-3) GS115; (3-4) GS115 con pPIC9; (5-6-7) GS115 con pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3.

6.3.1.1 Detección del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 por Dot-blot

Por otro lado se realizó un ensayo de Dot-blot la cual es una técnica muy parecida a la técnica de Western-blot, sin embargo esta no implica la separación electroforética. La similitud entre estas dos técnicas es en la utilización de anticuerpos específicos y una membrana donde las proteínas son depositadas e identificadas. Debido a la falta de una

etapa de separación, esta técnica no nos permite determinar el peso molecular, en su lugar, nos permite estimar la concentración de la proteína en preparaciones brutas tales como sobrenadante de medio de cultivo o extractos crudos de tejido. Además esta técnica también nos permite determinar la funcionabilidad de los anticuerpos y estandarizar las diluciones de los mismos (Cabrera-Blanco *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos a partir de esta técnica nos permitieron confirmar la especificidad de los anticuerpos empleados además de la detección de la proteína recombinante (PE Δ III-LC3-KDEL3) expresada en el medio de cultivo obtenido a las 24 h de inducción. Como se muestra en la Figura 19a, la inmunodetección con el anticuerpo anti-6X His-tag mostro especificidad evidenciando una reacción positiva a la proteína producida en las clonas transformadas (GS115-pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3), estos resultados al compararlos con los controles de expresión los cuales fueron extractos de medio de cultivo con la cepa GS115 sin el vector y GS115 con el vector pero sin el gen de interés nos confirman la especificidad del anticuerpo, ya que en estos no se observó reacción.

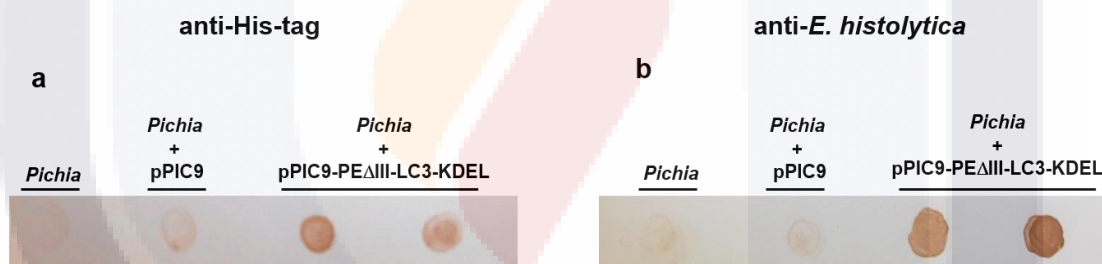


Figura 19. Identificación de PE Δ III-LC3-KDEL3 recombinante mediante Dot-blot. Las proteínas recombinantes producidas por *P. pastoris* transformadas con pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 mostraron reacción positiva al utilizar (a) anticuerpo anti-6X His o (b) anti-*E. histolytica*. El control negativo fue medio de cultivo de *Pichia* y *Pichia* + pPIC9.

En la figura 19b se realizó el mismo ensayo sin embargo para este se utilizó un anticuerpo *anti-E. histolytica*, el cual reconoce el epítopo LC3, este mostro de igual forma una especificidad y reacción positiva a la proteína con el medio de cultivo obtenido de la inducción realizada en clonas GS115-pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. Los controles utilizados fueron los mismos que se emplearon para la inmunodetección con el anti-6X His-tag.

6.3.2 Producción del antígeno recombinante en biorreactor

La fermentación de las cepas recombinadas fue llevada a cabo en una fermentación a nivel de biorreactor de 3 litros. Las pruebas se realizaron a las clonas productoras (identificadas y caracterizadas previamente) de la proteína PE Δ III-LC3-KDEL3. Las fases evaluadas durante este proceso fueron:

a) *Fase de adaptación con glicerol*: en este periodo las células se estabilizan y se adaptan en el medio de cultivo, con ello se permite su crecimiento y preparación para las siguientes etapas. El glicerol inicial en esta fase fue de 30.29 g/L se mantuvo estable hasta las 8 h del cultivo, posteriormente cayó drásticamente a las 21 h donde los valores obtenidos arrojan 1.64 g/L. La densidad de biomasa al inicio del proceso fue de 1.87 g/L, y al final de la etapa se observa un incremento de 23.2 g/L. Lo cual nos indica que el decremento de la cantidad de glicerol está relacionada con el crecimiento de biomasa, ya que entre más biomasa se encuentre en el medio más consumo de glicerol se requiere (Figura 20a).

b) *Fase de inducción*: En este periodo las células ya crecidas y adaptadas comienzan a ser estimuladas para la producción de la proteína de interés. Después del agotamiento del glicerol, y cuando el DO cayó por debajo del SP (30% de DO), se inició la etapa de inducción (24 h del proceso). Esta se inició con la adición de metanol una concentración final de 0.05% v/v y manteniendo esta concentración para el resto de la fase de producción. La adición de metanol fue automática. Las fermentaciones se establecieron hasta un tiempo de corrida de 100 h.

El pH durante este proceso se mantuvo en condiciones estables (pH 5.5). Al inicio de esta etapa los valores de biomasa fueron de 23 g/L, el incremento de biomasa se observó entre las 32 y 48 h del proceso, en la etapa final de la fermentación la biomasa obtenida fue de 53.4 g/L (Figura 20b). Sin embargo, conforme se desarrolló el proceso, se pudo observar que a las 72 h la biomasa ya no incrementó significativamente sus valores y las variaciones en crecimiento permanecieron casi en valores iguales.

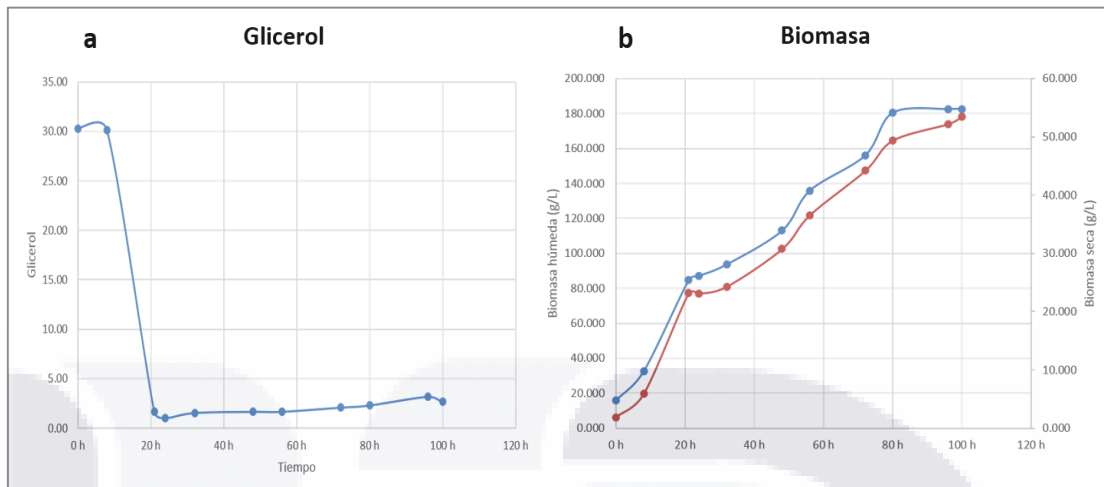


Figura 20. Consumo de glicerol y crecimiento de biomasa obtenido durante la fermentación.
 (a) Los resultados obtenidos demuestran que durante las primeras etapas de la fermentación existe un agotamiento de glicerol lo cual permite el incremento de (b) biomasa necesaria para para la fase de producción

6.3.2.1 Detección del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3

La detección de la producción de la proteína recombinante (PE Δ III-LC3-KDEL) se analizó durante la fase de inducción a partir de alícuotas de cultivo retiradas en varios intervalos de tiempo (0, 8, 21, 24, 32, 48, 56, 72, 80, 96 y 100 h). El análisis se realizó mediante SDS-PAGE (Figura 21) y su cuantificación se llevó a cabo por el método de Bradford. Los resultados obtenidos muestran que en las primeras horas del proceso tanto en la fase de adaptación y en la de inducción (0 a las 32 h) la concentración de proteínas totales permaneció sin cambio alguno. Posteriormente a las 48 h se observó un incremento de las proteínas casi al doble (2.87 mg/ml) en comparación con las proteínas detectadas en las primeras horas del proceso (1.83 mg/ml). A partir de este tiempo las concentraciones de las proteínas incrementaron paulatinamente obteniendo su pico máximo hasta las 100 h (3.88 mg/ml). La cantidad de proteína obtenida al final de este proceso fue de 3.8 g/L (Figura 22a). Cabe mencionar que las bandas identificadas durante las 100 h del proceso en el gel de electroforesis muestran una proteína de aproximadamente 67 kDa.

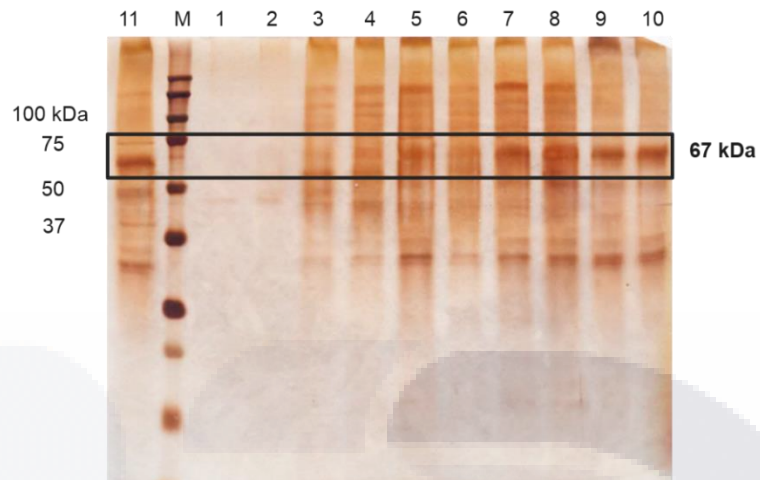


Figura 21. Producción de proteínas durante la fermentación. Los sobrenadantes de cultivo sin células se analizaron mediante SDS-PAGE 12% a partir de muestras tomadas directamente antes de la adición de metanol (tiempo 0, 8, 21) y 24, 48, 56,72, 80, 96 y 100 horas después del inicio de la alimentación con metanol. Carriles: (M) marcador de peso molecular; (1-3) muestras del cultivo recuperadas antes de la inducción con metanol; (4-11) muestras recuperadas a partir de la inducción con metanol.

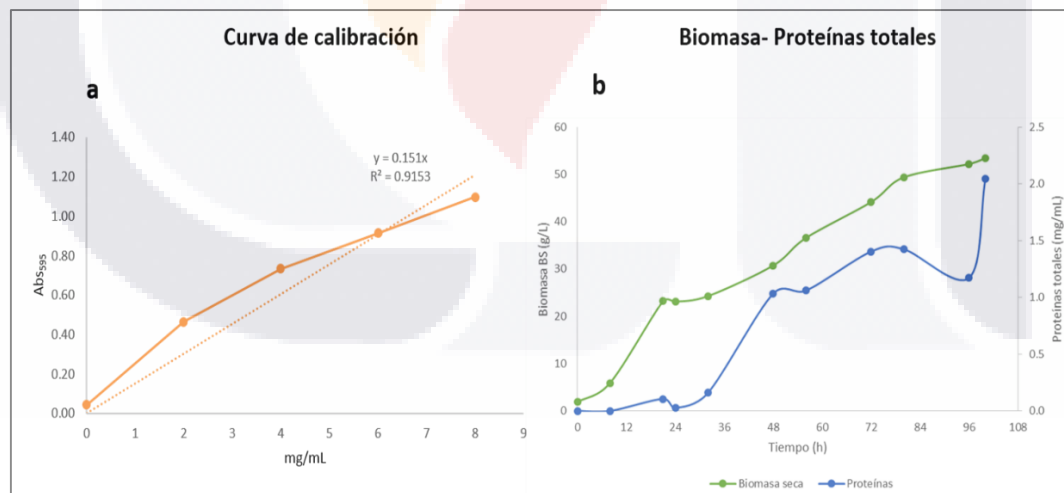


Figura 22. Fase de inducción: proteínas totales y biomasa. (a) Curva de calibración para la determinación de las proteínas totales (b) relación proteínas totales y biomasa.

En lo que respecta a la relación de la cantidad de biomasa con la concentración de las proteínas, se encontraron niveles más altos de biomasa que de proteínas totales (Figura 22b). Sin embargo conforme se da el proceso se puede observar que a las 72 h la biomasa ya no incremento significativamente sus valores y las variaciones en crecimiento permanecieron casi los mismos valores.

En la figura 23 solo se muestran las condiciones empleadas durante la fermentación.

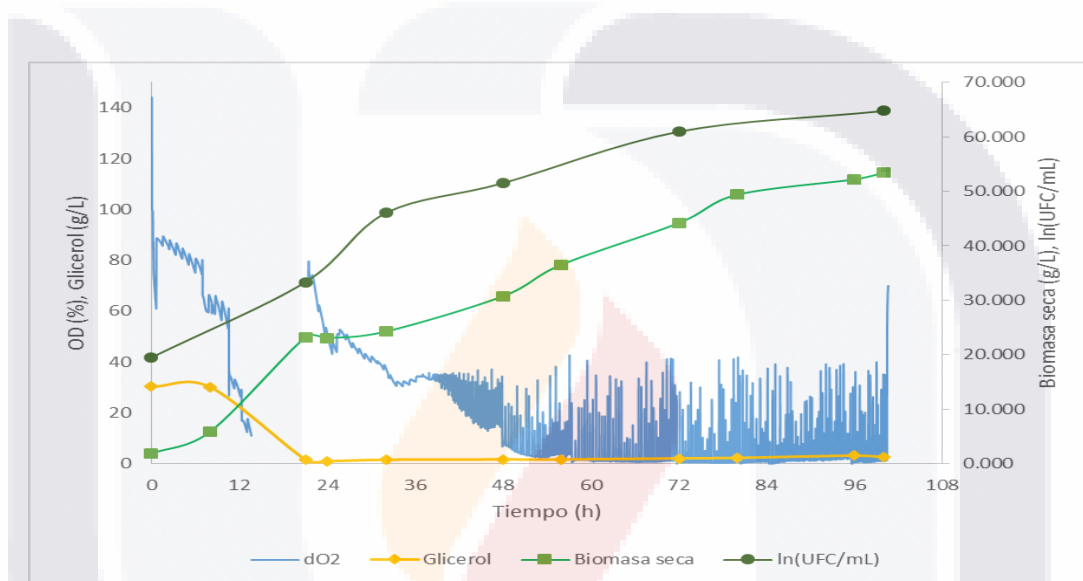


Figura 23. Gráfico de los parámetros establecidos durante la fase de inducción.

6.3.2.2 Identificación de glicosilaciones en PE Δ III-LC3-KDEL3

Una vez terminado el proceso de fermentación el caldo (1.5 L) fue clarificado, dializado y concentrado en un volumen de 10 ml utilizando un ultrafiltrador (Amicon® Stirred Ultrafiltration Cells) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Esto nos permitió trabajar con volúmenes más pequeños de las proteínas obtenidas.

Las proteínas fueron analizadas antes y después de la purificación, donde en los extractos crudos obtenidos antes de la purificación fueron separados electroforéticamente, donde logramos identificar una banda de un peso molecular de aproximadamente 67 kDa (Figura 24a) la cual una vez llevado a cabo la electroforesis de las fracciones purificadas mostro el mismo resultado al evidenciar única banda de 67 kDa (Figura 24b), el porcentaje de

recuperación cuantificado de las fracciones purificadas fue de un 44%. Cabe mencionar que este resultado fue consistente con el resultado observado en la inducción a nivel matraz.

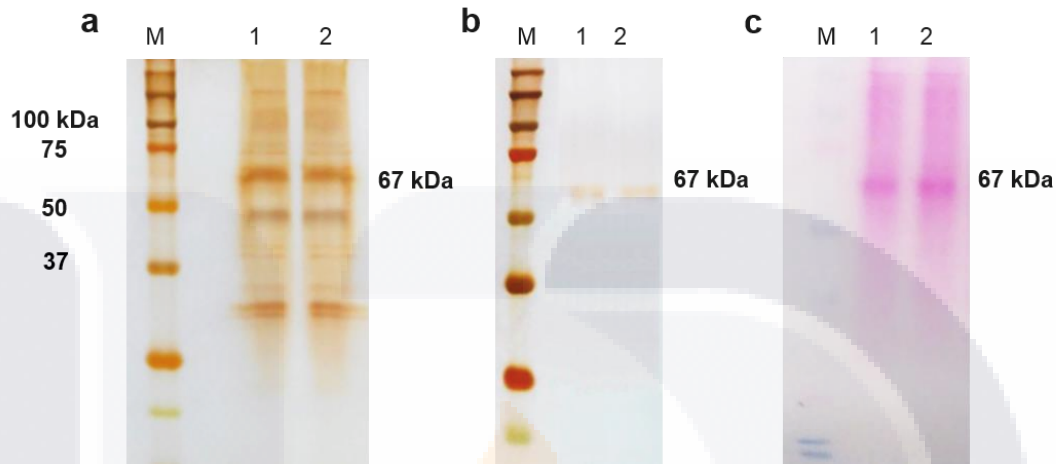


Figura 24. Análisis de la proteína recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 mediante electroforesis (SDS-PAGE). El carril izquierdo de los tres gels mostrados contiene los mismos marcadores de peso molecular. Las líneas 1 y 2 representan dos clones diferentes de *Pichia* transformada. La proteína recombinante se detectó (a) en el sobrenadante y (b) después de la purificación con una columna con afinidad a la etiqueta de 6-Histidina, (c) muestra la presencia de glicosilaciones de las proteínas.

La habilidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes como las glicosilaciones es una de las grandes ventajas que ofrece este sistema de expresión, su identificación es muy importante cuando se está trabajando con proteínas que han sido diseñadas para funciones inmunoestimulantes, para comprobar esta característica realizamos una tinción de PAS en gels de poliacrilamida, la cual es una técnica que emplea reactivos que se unen fácilmente a los carbohidratos los cuales al ser oxidados se incrementan los grupos aldehído o cetona, esto permite la unión del reactivo de dando una coloración rosa-violeta (Walwyn *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos a partir de esta técnica mostraron una reacción positiva en el gel de electroforesis obtenido de las fracciones purificadas, la cual nos indica que la proteína de interés muestra la presencia de glicosilaciones en su estructura y además esta positividad fue identificada en una banda que se encuentra aproximadamente en los 67 kDa (Figura 24c).

6.3.2.3 Inmunodetección del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 mediante Western-blot

Por otro lado, mediante Western-blot se llevó a cabo la detección del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3, el cual fue analizado a partir de las fracciones purificadas del medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas purificadas fueron reactivas frente al anticuerpo anti-6X His-tag. El peso molecular de la proteína detectada por este método fue de 67 kDa (Figura 25a) lo cual comparándolo con los resultados obtenidos en geles de electroforesis obtenidos de la inducción a nivel matraz corrobora dichos resultados.

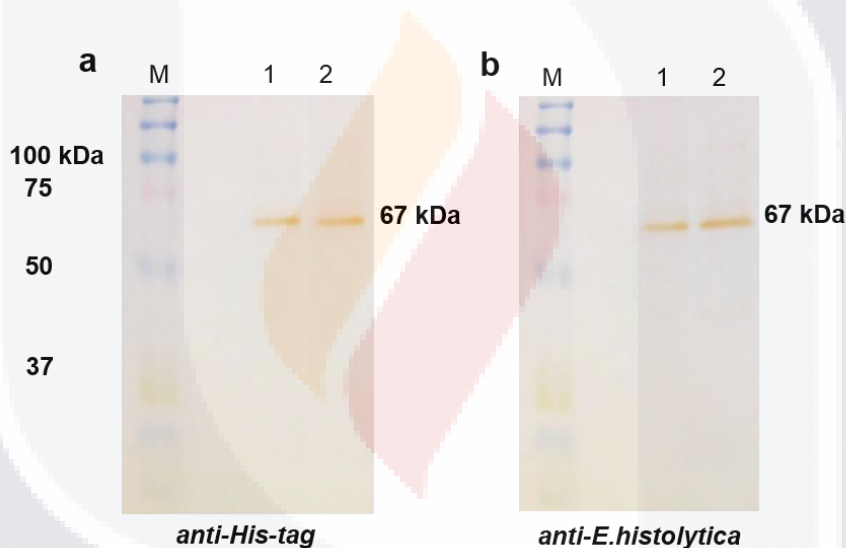


Figura 25. Western-blot para la identificación del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3. El carril izquierdo de los dos geles mostrados contiene los mismos marcadores de peso molecular. (a) Las líneas 1 y 2 muestran el análisis Western-blot con el anticuerpo anti 6X His-HRP y (b) con el anti-*E. histolytica*, respectivamente, donde se demuestra la expresión heteróloga de una proteína de 67 kDa.

Para confirmar que la proteína recombinante presentara el fragmento LC3 derivado de la subunidad pesada de la lectina de *E. histolytica*. Se realizó también un Western-blot donde ahora el anticuerpo utilizado fue un anti-*E. histolytica* el cual reconoce diferentes proteínas derivadas del parásito dentro una de ellas es el fragmento LC3. Los resultados obtenidos

con el anti-*E. histolytica* mostro una especificidad de reacción en una proteína detectada aproximadamente en 67 kDa. (Figura 25b).

Hasta aquí podemos observar que con los resultados obtenidos y analizados en este trabajo, se ha logrado producir una proteína recombinante de aproximadamente 67 kDa de peso molecular la cual ha sido identificada por la especificidad de dos anticuerpos diferentes los cuales están reconociendo dos de las regiones que fueron incluidas durante su diseño, y además este se logró producir en pequeña y gran escala en un sistema de expresión heterólogo como es el de la levadura metilotrófica *P. pastoris*.

6.4 Bioensayo para determinar actividad biológica del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3

6.4.1 Producción de anticuerpos específicos frente al antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3

Como el objetivo de este trabajo fue generar una proteína recombinante capaz de inducir una respuesta inmune protectora frente a la infección causada por *E. histolytica*, los ensayos de actividad biológica consistieron en la evaluación de la respuesta inmune en animales previamente inmunizados con este antígeno. Para ello se trabajó con 4 grupos de animales, el grupo vehículo (100 μ l de PBS estéril), el grupo 30 (30 μ g/dosis/animal del antígeno), el grupo 50 (50 μ g/dosis/animal del antígeno) y el grupo 100 (100 μ g/dosis/animal del antígeno). Las inmunizaciones y los sangrados de los animales se llevaron a cabo como se describe en la sección 5.6.2. Una vez obtenidos los sueros preinmunes e inmunes de los animales inmunizados con la proteína recombinante, se midieron los niveles de la IgG total por el método de ELISA.

Los resultados obtenidos muestran que los sueros inmunes de los grupos 50 y 100 presentaron niveles significativos de IgG comparadas con el grupo vehículo y con los sueros preinmunes. La concentración de IgG fue 2,1 y 2,03 veces superiores a las concentraciones de IgG en los grupos sin inmunizar, estos resultados indican que la inmunización con este antígeno provoca una respuesta inmune notable (Figura 26).

Entre el grupo 50 y 100 el nivel de IgG obtenida no mostro diferencia significativa por lo cual la concentración óptima de antígeno que estimula la respuesta inmune es de 50 μg . Los niveles de IgG de los sueros preinmunes se encontraron en concentraciones basales. Cabe mencionar que aún se están llevando a cabo ensayos inmunológicos para una mejor evaluación de la actividad biológica del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3.

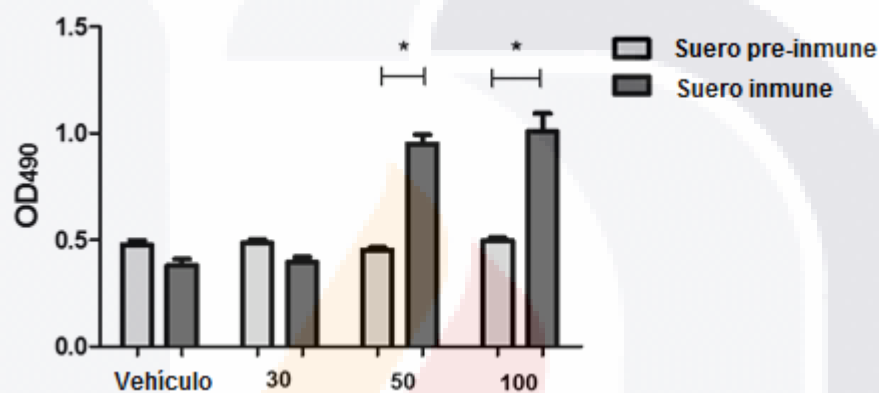


Figura 26. PE Δ III-LC3-KDEL3 induce la producción de anticuerpos IgG. Hámsteres machos fueron inmunizados subcutáneamente a los 1, 7 y 14 días, utilizando el antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 sin adyuvante. Las dosis utilizadas en los diferentes grupos fueron de 30, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Los sueros obtenidos fueron evaluados mediante ELISA. La administración subcutánea de 50 y 100 μg de PE Δ III-LC3-KDEL3 recombinante indujo incrementos significativos de anticuerpos IgG. Las barras representan la media \pm S.E.M de 3 experimentos. El análisis estadístico se realizó utilizando una ANOVA de una vía * ($P < 0,01$).



7. DISCUSIONES

E. histolytica es el agente causal de la amibiasis, una de las tres principales causas de mortalidad por enfermedades parasitarias en todo el mundo (WHO, 1997). Los quistes del parásito se transmiten a través de alimentos y agua contaminada, haciendo la incidencia de la enfermedad alta en áreas con pobre saneamiento (Haque *et al.*, 2003). En países en desarrollo las poblaciones más afectadas por este parásito son especialmente los niños, ya que pueden sufrir desnutrición y retraso del crecimiento como resultado de infecciones repetidas (Mondal *et al.*, 2009). Las terapias farmacológicas tales como el metronidazol y otros compuestos derivados de los nitroimidazoles son eficaces para tratar parásitos invasivos. Sin embargo, se ha visto que estos fármacos presentan efectos secundarios adversos y además, para algunos países o regiones son de difícil acceso (Leitsch *et al.*, 2007). En la actualidad el desarrollo de vacunas sigue siendo una alternativa atractiva para evitar ésta y otro conjunto de enfermedades, a un que para la amibiasis no existe una vacuna que se haya empleado en ensayos clínicos en humanos, se han realizado una gran cantidad de estudios basados en las proteínas del parásito que al ser evaluadas en modelos animales han generado una buena respuesta inmunitaria (Quach *et al.*, 2014).

El objetivo de este trabajo consistió en el diseño, producción y evaluación de un proteína recombinante de fusión con características inmunogénicas con la finalidad de desarrollar una vacuna eficaz contra *E. histolytica*. Para cumplir con este objetivo, el diseño del antígeno se basó en la secuencia génica que codifica al fragmento LC3 encontrado en la subunidad pesada de 170 kDa de la Gal-GalNac (Soong *et al.*, 1995). La lectina Gal-GalNac es una de las proteínas del parásito más ampliamente estudiada, (Chadee *et al.*, 1988; Petri *et al.*, 2002). Su complejo estructural ha sido bien caracterizado y se ha observado que de las dos subunidades que dan forma a su estructura, solo una de ellas, la subunidad pesada (170 kDa) es considerada estructuralmente la más inmunogénica (Abd-All, 2004) ya que presenta una región (LC3) rica en carbohidratos que, al ser evaluada en modelos *in vivo* ha logrado inducir la producción de anticuerpos específicos (Soong *et al.*, 1995). Por otro lado también fue incluida, la secuencia del gen de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE), con delección en el dominio III (PE Δ III) (Weldon y Pastan 2013) y la secuencias KDEL-3 (Liao *et al.*, 2005). La estrategia de utilizar los dominios I y II de la exotoxina A de

Pseudomonas aeruginosa, es debido a la capacidad que tiene la proteína de unirse a un receptor de superficie celular (dominio I) y la capacidad de la translocación desde los compartimentos endosómicos/lisosómicos al citoplasma (dominio II) (Siegal *et al.*, 1991, Chaudhary *et al.*, 1990, Prior *et al.*, 1992). KDEL3 por su parte permite el movimiento retrogrado de las proteínas al retículo endoplásmico (Raykhel *et al.*, 2007; Sallese *et al.*, 2009), por lo cual cuando el antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 se administre pueda ser más fácilmente captado por las células para su procesamiento y que éste sea dirigido hacia la presentación de antígenos endógenos y exógenos (MHC de clase I y II) (Liao *et al.*, 2005).

La secuencia denominada en este trabajo PE Δ III-LC3-KDEL3 fue inicialmente sintetizada y clonada en el pUC57 con optimización de codones y enviada al banco de genes del NCBI (número de acceso: KY657281). Posteriormente para su producción se realizaron una serie de ensayos que nos permitieron llevar a cabo las clonaciones del gen PE Δ III-LC3-KDEL3 en el vector de expresión pPIC9, el cual como característica principal presenta el gen AOX1 sobre el cual se hace la inserción del gen que codifica para la proteína de interés, así como la presencia de un péptido señal, que permite que la proteína sea secretada al medio extra celular (Cregg *et al.*, 1985). Los resultados a partir de la PCR mostraron varias clonas pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 positivas, donde los productos de amplificación obtenidos verifican cada una de las regiones que conforman el gen de expresión (Figura 14).

La expresión del antígeno recombinante se realizó empleando el sistema basado en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. El cual se ha establecido como uno de los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas recombinantes (Cereghino y Cregg, 2000). Uno de los eventos más importantes que se deben de verificar antes de la inducción de la proteína, es la integración del vector de expresión en el genoma de la levadura. El cual es un fenómeno que se da por recombinación homóloga entre las secuencias comunes del vector y el genoma del hospedero (Bawa *et al.*, 2014). Los vectores convencionalmente utilizados como en este caso el pPIC9 presentan sitios que facilita la inserción de una forma exitosa y segura (Cereghino y Cregg, 2000). La integración se da en el sitio AOX1, es por ello que para la PCR se utilizan los oligonucleótidos específicos para esta región. En nuestros resultados comprobamos la integración del gen PE Δ III-LC3-KDEL3 en el genoma de esta levadura. La amplificación obtenida a partir de los

oligonucleótidos AOX1 muestra un producto 2 848 pb (Figura 17) en por lo menos dos clonas recombinantes.

Para la producción de PE Δ III-LC3-KDEL3 se realizaron ensayos de inducción en pequeña escala (nivel matraz), los cuales posteriormente fueron escalados en un biorreactor de tanque agitado. La expresión de PE Δ III-LC3-KDEL3 a nivel matraz se evaluó a las 24 h de inducción y el producto obtenido se confirmó mediante SDS-PAGE y Dot-blot. Los resultados obtenidos de este análisis nos permitieron detectar proteínas en el sobrenadante del medio de cultivo obtenido de *P. pastoris*, donde las bandas identificadas mostraron una proteína de aproximadamente 67 kDa en clonas diferentes (Figura 18), y además los anticuerpos empleados para el Dot-blot mostraron reacción positiva en el extracto crudo de proteínas evaluadas en el sobrenadante (Figura 19).

Para el escalamiento de PE Δ III-LC3-KDEL3 en un biorreactor de tanque agitado (Gurramkonda *et al.*, 2009), las células se cultivaron usando un medio simple definido con baja cantidades de sales y alto contenido de glicerol. Después del crecimiento, la producción de PE Δ III-LC3-KDEL3 se llevó a cabo a concentraciones de metanol de 0.05%v/v que se mantuvieron constantes durante toda la fase de producción restante. Esta estrategia de alimentación condujo a la secreción de 3.8 gramos de proteína por litro de caldo de cultivo. Los parámetros controlados durante el proceso fueron establecidos a partir del inicio de la fermentación, el DO se mantuvo en un 30%, el pH en 5.5, la temperatura en 30°C y el porcentaje de metanol fue estable durante todo el proceso. La productividad de *P. pastoris* en matraces agitados es típicamente más baja y se mejora grandemente en cultivos efectuados en fermentadores más grandes debido a las condiciones controladas para el establecimiento de diferentes parámetros. Las variaciones en pH, oxígeno y metanol determinan el porcentaje de biomasa y del producto obtenido. Se ha observado que el pH reduce el riesgo de contaminación por diferentes agentes, sin embargo éste causa un efecto significativo sobre las proteínas recombinantes secretadas, debido a la actividad de las proteasas en el caldo de fermentación (Cregg *et al.* 1993; Inan *et al.* 1999; Files *et al.* 2001). Un parámetro clave del proceso de producción es la tasa específica de captación de metanol. Para controlar la captación de metanol y mantener simultáneamente una concentración constante se debe establecer una concentración inicial la cual puede mantenerse estable o incrementarse durante el proceso, algunos autores han reportado

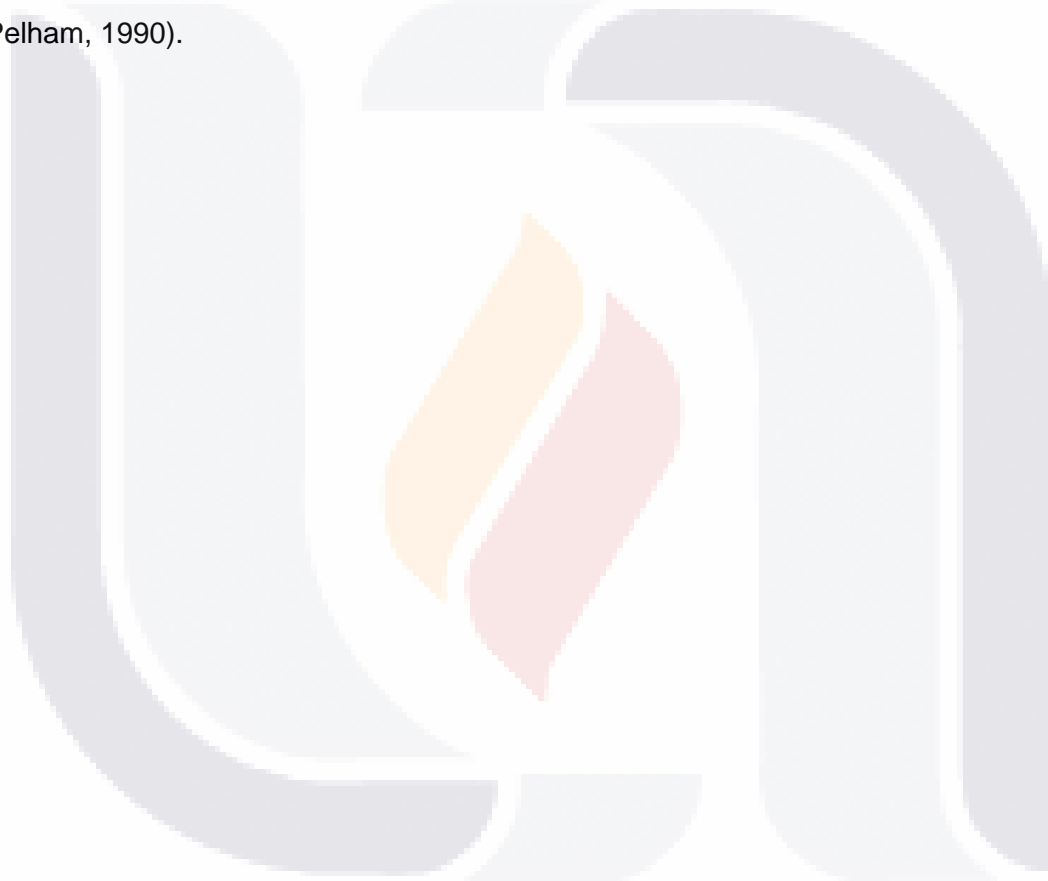
que ha mayor concentración de metanol hay mayor probabilidad de producción del producto, sin embargo existen también reportes donde éste también puede causar una intoxicación en las células lo que conlleva a una disminución del mismo (Gurramkonda *et al.*, 2010).

Una vez finalizada la fermentación las proteínas fueron purificadas a través de una cromatografía de afinidad, la cual retiene proteínas marcadas con una etiqueta de 6 histidinas. El porcentaje de recuperación obtenido de la columna fue de un 44%. La proteína detectada en las fracciones purificadas fue de 67 kDa (Figura 24), posteriormente para comprobar si la proteína correspondía al antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3, se realizó una inmunodetección con anticuerpos específicos. En la inmunodetección el anticuerpo anti-6X His tag mostro reactividad específica frente a la proteína, este resultado fue consistente con el anticuerpo anti-*E. histolytica*, el cual también mostro reactividad específica a la proteína de 67 kDa (Figura 25). Sin embargo a un que la inmunodetección con anticuerpos específicos para dos regiones flanqueantes de la proteína muestra una reactividad positiva, el análisis *in silico* arroja un peso molecular mayor, de aproximadamente 88 kDa. Las glicosilaciones son una de las modificaciones postraduccionales más importantes al utilizar un sistema de expresión a partir de levaduras. Varios estudios han demostrado que la glicosilación en *P. pastoris* da lugar en general a proteínas recombinantes que tienen un mayor peso molecular que las correspondientes proteínas producidas en sistemas de expresión de mamíferos (Braren *et al.*, 2007). Nosotros para comprobar esta característica, realizamos a través de una tinción, la identificación de glicosilaciones las cuales dieron positivas a la proteína de aproximadamente 67 kDa. Por otro lado se ha visto casos en los que las proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* presentan un peso molecular más bajo que las producidas en otros sistemas. Sadhukhan y Sen (1996) postularon que este decremento del peso molecular puede deberse a la ausencia de otras modificaciones postraduccionales, como por ejemplo, la fosforilación, sulfatación y sialilación. Huang *et al* (2006) reportaron que al expresar las glicoproteínas de la envoltura del virus de la peste porcina clásica (E^{ms}) en *P. pastoris*, tiene un peso molecular más bajo de lo esperado pero con propiedades biológicas adecuadas.

Los ensayos biológicos son muy importantes para determinar la funcionabilidad de cualquier proteína expresada en sistemas heterólogos, las proteínas inmunogénicas

diseñadas para estos sistemas deben de permanecer con las mismas características sin alteraciones. Para probar la capacidad de PE Δ III-LC3-KDEL3 de inducir una respuesta inmune, se llevó a cabo la evaluación de IgG total en los sueros de los animales previamente inmunizados. La determinación de la IgG por ELISA se realizó de forma inicial en los sueros de los animales preinmunes, donde se pudo observar que en todos los grupos las concentraciones de IgG total se mantuvieron en concentraciones basales. Los resultados en los animales inmunizados mostraron que la administración del antígeno recombinante PE Δ III-LC3-KDEL3 induce un incremento significativo de los niveles de IgG total, la cual se incrementó 2.1 veces más en los grupos inmunizados comparados con el grupo control. La dosis de antígeno suministrado a cada uno de los grupos fue probada en concentraciones graduales donde la concentración de 100 μ g/dosis fue la que mostró un mejor efecto. Los resultados obtenidos a partir de este análisis muestran la capacidad del antígeno de inducir una respuesta inmunológica. En lo que respecta al fragmento LC3, es conocido por su capacidad de estimular la formación de anticuerpos específicos, Soong *et al.*, (1994) observan que al administrar LC3 recombinante junto con adyuvantes de forma intraperitoneal (10 μ g/Titermax) induce una respuesta de anticuerpos significativa. Además el tipo de anticuerpos producidos durante su administración son preferentemente de tipo IgA e IgG, esto observado en animales de experimentación (ratones, gerbos y primates (no humanos) (Lidell *et al.*, 2006; Dharmani *et al.*, 2009). Por otra parte, en el caso de los dominios I y II de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE Δ III) además de mediar la translocación de los compartimentos endosómicos al citoplasma, tiene la capacidad de funcionar como un adyuvante ya que la liberación específica de un antígeno extraño a las células presentadoras de antígeno a través de la unión específica del dominio I al receptor α -macroglobulina encontrado en macrófagos y monocitos (FitzGeerald *et al.*, 1998), permite que esta proteína controle un procesamiento intracelular de antígenos específicos activando respuesta inmunológicas celulares específicas para el antígeno (Chen *et al.*, 2001). Esto fue una consideración muy importante que se planteó desde el diseño del gen ya que la mayoría de los estudios llevados a cabo para el desarrollo de vacunas, se ven en la necesidad de utilizar diversos adyuvantes, los cuales como sabemos presentan características importantes para incrementar la respuesta inmune, sin embargo algunos autores refieren que estos pueden generar lesiones, como por ejemplo las lesiones asociadas con el uso del adyuvante de Freund, las cuales se describen como daños con necrosis focal y una respuesta inflamatoria granulomatosa con destacados macrófagos en

el sitio de la lesión (Stills, 2005), en lo que respecta al TiterMax®, éste induce la aparición de lesiones graves después de la administración intraperitoneal. (Leenaars *et al.*, 1998). Además cabe mencionar que los adyuvantes utilizados en los modelos animales, no son permitidos para su uso en humanos. En lo que respecta a KDEL es una secuencia de aminoácidos ubicados en la región carboxi-terminal, es una señal para la retención de proteínas en el retículo endoplásmico (Weldon y Pastan, 2011). La secuencia KDEL es reconocido por un receptor unido a la membrana que recupera continuamente las proteínas de un compartimento posterior de la vía secretora y los devuelve al retículo endoplásmico (Pelham, 1990).





8. CONCLUSIONES

- En este trabajo se logró diseñar y producir un proteína recombinante para el fragmento LC3 de *E. histolytica* fusionada a PE Δ III y KDEL con propiedades moleculares para generar una respuesta inmune.
- Los ensayos biológicos con esta proteína mostraron la capacidad inmunoestimulante del antígeno PE Δ III-LC3-KDEL3 al inducir niveles significativos de IgG.
- Se logró diseñar una construcción quimérica con características de adyuvante y que además su diseño permite la sustitución de fragmentos para generar vacunas contra diferentes antígenos.
- Se logró establecer un sistema a gran escala con condiciones óptimas para la producción en biorreactores.
- Esta proteína recombinante tiene aplicaciones futuras como inmunógeno en protocolos de vacunación contra *E. histolytica*.
- Este es el primer informe sobre el diseño y expresión de la proteína LC3 recombinante fusionada a PE Δ III y KDEL3, la cual tiene aplicaciones potenciales como un inmunógeno para la vacunación contra *E. histolytica*.



CAPÍTULO IX

9. GLOSARIO

AHA	Abceso hepático amibiano
Arg	Arginina
Asp	Asparagina
Ca²⁺	Calcio
CD	Marcadores inmunológicos
CEI	Células epiteliales intestinales
CFA	Adyuvante completo de Freud
CL	Células de Langerhans
CPA	Células presentadoras de antígeno
CRD	Porción rica en cisteínas
DC	Células Dendríticas
Eh29	Antígeno de 29 kDa de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhADH112	Adhesina de 112 kDa de <i>E. histolytica</i>
EhADH243	Dominio de adherencia 243 del complejo de la lectina de 112 kDa.
EhCP	Cisteín-proteasas
EhCPB30	Peroxiredoxina de unión a colágeno de 30 kDa
FEC-1	Factor estimulante de colonias 1
Gly	Glicina
HgL	Subunidad pesada
IFN-γ	Interferón gamma
Igl	Subunidad intermedia
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucinas
ITC	Inmunización transcutánea
KDEL	Péptido señal presente en células de mamífero
LgL	Subunidad ligera
LPPG	Lipofospeptidogilcano
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MPO	Mieloperoxidasa
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos

NF-κB	Factor nuclear kappa de las células B
Ng	nanogramos
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PE	Exotoxina de A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEΔIII	Exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> deletada en el dominio III
PE-I	Dominio I de la exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PNP	Purina nucleósido fosforilasa
REDL	Péptido señal en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRP	Receptores de reconocimiento de patrón
SOD	Superóxido dismutasa
SREHP	Proteína rica en serina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TMC	Células T de memoria central
TME	Células T de memoria efectoras
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa



10. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, MD. Jackson, TF. Soong, GC. Mazanec, M. Ravdin, JL. 2004. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infection and Immunity*. 72:3974-3980.
- Abd-Alla, MD. Jackson, TFGH. Rogers, T. Reddy, S. Ravdin, JI. 2006. Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infection and Immunity*. 74:3897-903.
- Abd-Alla, MD. Jackson, TFGH. Soong, GC. Mazanec, M. Ravdin, JI. 2004. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infection and Immunity*. 72:3974-80.
- Abrahamsen, MS. Templeton, TJ. Enomoto, S. Abrahante, JE. Zhu, G. Lancto, CA. Deng, M. Liu, C. Widmer, G. Tziporis, S. Buck, GA. Xu, P. Bankier, AT. Dear, PH. Konfortov, BA. Sprigg, HF. Lyer, L. Anantharaman, V. Aravind, L. Kapur, V. 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304:441-445.
- Aguilar-Diaz, H. Carrero, JC. Arguello-Garcia, R. Lacleste, JP. Morales-Montor, J. 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitol*. 27:450-8.
- Ahmad, M. Hirz, M. Pichler, H. Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*. 12:5301-17.
- Akira, S. Uematsu, S. Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Amulic, B. Cazalet, C. Hayes, GL. Metzler, KD. Zychlinsky, A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*. 30:459-489.

- Andra, J. Herbst, R. Leippe, M. 2003. Amoebapore archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Developmental and Comparative immunology*. 4:291-304.
- Ankri, S. Padilla-Vaca, F. Stolarsky, T. Koole, L. Katz, U. Mirelman, D. 1999. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Molecular Microbiology*. 33:327-337.
- Avery, DT. Ellyard, JI. Mackay, F. Corcoran, LM. Hodgkin, PD. Tangye, SG. 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *Journal Immunology*. 174:4034–4042.
- Avery, DT. Ellyard, JI. Mackay, F. Corcoran, LM. Hodgkin, PD. Tangye, SG. 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *Journal Immunology*. 174:4034-4042.
- Bansal, D. Ave, P. Kerneis, S. Frileux, P. Boché, O. Baglin, AC. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 3:e551.
- Bansal, D. Malla, N. Mahajan, RC. 2006. Drug resistance in amoebiasis. *Indian Journal of Medical Research*. 123:115-8.
- Barnaba, C. Gentry, K. Sumangala, N. Ramamoorthy, A. 2017. The catalytic function of cytochrome P450 is entwined with its membrane-bound nature. *F1000Res*. 6:662.
- Barroso L, Abhyankar M, Noor Z, Read K, Pedersen K, White R, Fox C, Petri WA Jr, Lyerly D. 2014. Expression, purification, and evaluation of recombinant LecA as a candidate for an amebic colitis vaccine. *Vaccine*. 10:1218-24.
- Baum, KF. Berens, RL. Marr, JJ. Harrington, JA. Spector, T. 1989. Purine deoxynucleoside salvage in *Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry*. 264:21087-21090.
- Bawa, Z. Routledge, SJ. Jamshad, M. Clare, M. Sarkar, D. Dickerson, I. Ganzlin, M. Poyner, DR. Bill, RM. 2014. Functional recombinant protein is present in the pre-induction phases of *Pichia pastoris* cultures when grown in bioreactors, but not shake-flasks. *Microbial Cell Factories*. 1: 127.
- Begum, S. Quach, J. Chadee, K. 2015. Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. *Frontiers in Microbiol*. 6:1394.

- Belyakov, IM. Hammond, SA. Ahlers, JD. Glenn, GM. Berzofsky, JA. 2004. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *Journal of Clinical Investigation*. 113:998-1007.
- Bendesky, A. Menendez, D. Ostrosky-Wegman, P. 2002. Is metronidazole carcinogenic?. *Mutation Research*. 511:133-144.
- Beving, DE. Soong, CJ. Ravdin, JI. 1996. Oral immunization with a recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has in vitro adherence inhibition activity. *Infection and Immunity*. 64:1473-6.
- Birnboim, HC. Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7:1513-1523.
- Black, AP. Ardern-Jones, MR. Kasprovicz, V. 2007. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *European Journal Immunology*. 37:1485–1493.
- Black, RE. Cousens, S. Johnson, HL. Lawn, JE. Rudan, I. Bassani, DG. Jha, P. Campbell, H. Walker, CF. Cibulski, R. Eisele, T. Liu, L. Mathers, C. Child health epidemiology, Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: A systematic analysis. *Lancet*. 375:1969–87.
- Blazquez S, Rigotherier MC, Huerre M, Guillen N. 2007. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/ N-acetyl-D-galactosamine lectin. *International Journal of Parasitology*. 37:425-433.
- Blessmann, J. Van-Linh, P. Un, PAT. Thi, HD. Muller-Myhsok, B. Buss, H. Tannich, E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*. 66:578-83.
- Boland, EL. Van, Dyken, CM. Duckett, RM. McCluskey, AJ. Poon. GM. 2013. Structural Complementation of the Catalytic Domain of *Pseudomonas* Exotoxin A. *Journal of molecular biology*. 3:645-55.

- Boullier, S. Tanguy, M. Kadaoui, KA. Caubet, C. Sansonetti, P. Corthesy, B. Phalipon, A. 2009. Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by downregulating inflammatory circuits. *Journal Immunology*. 183.
- Bracha, R. Nuchamowitz, Y. Mirelman, D. 2003. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryotic Cell*. 2: 295–305.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 2:248-254.
- Brandtzaeg, P. 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*. 25:5467–5484.
- Brandtzaeg, P. 2009 Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavia Journal Immunology*. 70:505–515.
- Braren, I. Greunke, K. Umland, O. Deckers, S. Bredehorst, R. Spillner, E. 2007. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 47:205-214.
- Bruchhaus, I. Loftus, BJ. Hall, N. Tannich, E. 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell*. 2:501-509.
- Bruchhaus, I. Richter, S. Tannich, E. 1997. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical Journal*. 8326:785–789.
- Bruchhaus, I. Roeder, T. Lotter, H. Schwerdtfeger, M. Tannich, E. 2002. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Molecular Microbiology*. 44:1063-1072.
- Cabrera-Blanco, O. Pisionero-Triana, M. Rodríguez-Bejarano, M. Pérez-Nicado, R. González-Aznar, E. Rodríguez-Noda, L. Pedroso-Fernández, J. García-Rivera, D. 2017. Dot Blot para determinar la identidad antigénica en vacunas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F. 26:1-7.

- Campos-Rodriguez, R. Gutierrez-Meza, M. Jarillo-Luna, RA. Drago-Serrano, ME. Abarca-Rojano, E. Ventura-Juárez, J. Cárdenas-Jaramillo, LM. Pacheco-Yepez, J. 2016. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite*. 23:6.
- Carrero, JC. Contreras-Rojas, A. Sánchez-Hernández, B. Petrosyan, P. Bobbes, RJ. Ortiz-Ortiz- L. Laclette, JP. 2010. Protection against murine intestinal amoebiasis induced by oral immunization with the 29 kDa antigen of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin. *Parasitology*. 3:359-65.
- Castillo-Solorzano, C. Reef, SE. Morice, A. Vascones, N. Chevez, AE. Castalia-Soares, R. Torres, C. Vizzotti, C. Ruiz-Matus, C. 2011. Rubella vaccination of unknowingly pregnant women during mass campaigns for rubella and congenital rubella syndrome elimination, the Americas 2001–2008. *Journal of Infectious Disease*. 2: S713-S717.
- Cereghino, JL. Cregg, JM. 2000. Heterologous protein expression in the metylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1:45-66.
- Cerutti, A. 2008. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunology*. 1:8–10.
- Chadee, K. Meerovitch, E. 1984. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1:47-54.
- Chandrakant, L. 2016. Vaccine epidemiology: A review. *Journal of Family Medicine and Primary care*.1:7-15.
- Chang, SY. Cha, HR. Igarashi, O. Rennert, PD. Kissenpfennig, A. Malissen, B. Nanno, M. Kiyono, H. Kweon, MN. 2008 Langerin+ dendritic cells in the mesenteric lymphnode set the stage for skin and gut immune system cross-talk. *Journal of Immunology*. 180:4361-4365
- Chaudhary, VK. Jinno, Y. FitzGerald, D. Pastan, I. 1990. *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 87:308-12.
- Chen, JR. Liao, CW. Mao, SJ. Weng, CN. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Veterinary Microbiology*. 4:347-57.

- Chen, Y. Chou, K. Fuchs, E. Havran, WL. Boismenu, R. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 14:338–14 343.
- Cheng, XJ. Hughes, MA. Huston, CD. Loftus, B. Gilchrist, CA. Lockhart, LA. Gosh, S. Miller-Sims, V. Mann, BJ. Petri, WA Jr. Tachibana, H. 2001. Intermediate Subunit of the Gal/GalNAc Lectin of *Entamoeba histolytica* Is a Member of a Gene Family Containing Multiple CXXC Sequence Motifs. *Infection and Immunity*. 9: 5892–5898.
- Choi, M. Sajed, D. Poole, L. Hirata, K. Herdman, S. Torian, BE. Reed, SL. 2005. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1:80-9.
- Clark, RA. Chong, B. Mirchandani, N. Brinster, NK. Yamanaka, K. Dowgiert, RK. Kupperts, TS. 2006. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *Journal of Immunology*. 176:4431-4439.
- Cook, GC. 1990. Parasitic disease in clinical practice. The Bloomsbury series in clinical science. Lond on GB. 103-112.
- Cregg, JM. Barringer, KJ. Hessler, AY. Madden KR. 1985. *Pichia Pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cell Biology*. 5:3376-3385.
- Crispe, IN. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annual Reviews of Immunology*. 27:147-163.
- Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). 2011. *Annual Review Immunology*. 29:621-663.
- Czerkinsky, C. Holmgren, J. Philos, T. 2015. Vaccines against enteric infection for the developing world. *Biology Scientis*. 370:1671.
- Daly, R. Hearn, MT. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. 18:119-38.
- Darby, RA. Cartwrigh, SP. Dilworth, MV. Bill, RM. 2012. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review). *Methods Mololecular Biology*. 866:11-23.

- Denis, M. Chadee, K. 1989. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Journal of Leukocyte Biology* 46:70-274.
- Denis, M. Chadee, K. 1989. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology*. 3:270–274.
- Dey, I. Keller, K. Belley, A. Chadee, K. 2003. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100:3561-13566.
- Dharmani, P. Srivastava, V. Kisson-Singh, V. Chadee, K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*. 1:123-35.
- Duarte, MC. Lage, DP. Martins, VT. Chávez-Fumagalli, MA. Roatt, BM. Menezes-Souza, D. Goulart, LR. Soto. M. Tavares, CA. Coelho, EA. 2016. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 4:398-407.
- Faust, DM, Marquay, J. Markiewicz, J. Santi-Rocca, J. Guillen, N. 2011. New insights into host–pathogen interactions during *Entamoeba histolytica* liver infection. *European Journal Microbiology and Immunology*. 1:10-8.
- FitzGerald, DJ. Fryling, CM. Vennari, JC. Wrin, T. Cromwell, MEM. Daugherty, AL. Mrsnl, RJ. 1998. V3-Loop. Pseudomonas exotoxin, Chimeras: characterization of novel candidates for vaccination against human immunodeficiency virus-1. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 9951-8.
- Fominaya, J. Uherek, C. Wels, W. 1998. A chimeric fusion protein containing transforming growth factor- α mediates gene transfer via binding to the EGF receptor. *Gene Therapy*. 4:521-30.
- Fominaya, J. Wels, W. 1996. Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system. *Journal Biological Chemistry*. 271:10560–8.
- Galván-Moroyoqui, JM. Del Carmen Domínguez-Robles, M. Meza, I. 2011. Pathogenic bacteria prime the induction of toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc

lectin carbohydrate recognition domain of *Entamoeba histolytica*. International Journal of Parasitology. 41:1101-12.

Garcia-Nieto, RM. Rico-Mata, R. Arias-Negrete, S. Avila, EE. 2008. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. Parasitology International. 57:417-23.

Garver, KA. LaPatra, SE. Kurath, G. 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. Diseases of Aquatic Organism. 64:13-22.

Gay, NJ. Gangloff, M. 2007. Structure and function of toll receptors and their ligands. Annual Review of Biochemistry. 76:141-65.

Germanier, R. Fuer, E. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. J Infectious Disease. 131:553-558.

Gheorghe, MB. Octavio, TR. Lara, AR. 2013. Vacunas de DNA plasmídico. Una Herramienta Terapéutica Emergente. pp 340.

Giannini, SL. Hanon, E. Moris, P. Van-Mechelen, M. Morel, S. Dessy, F. Fourneau, MA. Colau, B. Suzich, J. Losonksy, G. Martin, MT. Dubin, G. Wettendorff, MA. 2006. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. Vaccine. 24:5937-5949.

Gilchrist, C. Petri, WA Jr. 1999. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. Current Opinion in Microbiology. 2:433-437.

Glenn, GM. Scharton-Kersten, T. Vassell, R. 1998. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. Journal of Immunology. 161:3211-3214.

Goletz, TJ. Klimpel, KR. Leppla, SH. Keith, JM. Berzofsky, JA. 1997. Delivery of antigens to the MHC class I pathway using bacterial toxins. Human Immunology. 2:129-36.

González-Vázquez MC, Carabarin-Lima A, Baylón-Pacheco L, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL. 2012. Obtaining of three recombinant antigens of *Entamoeba histolytica* and

evaluation of their immunogenic ability without adjuvant in a hamster model of immunoprotection. *Acta Tropica*. 2:169-76.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 3:23-35.

Greenwood, B. Dicko, A. Sagara, I. Zongo, I. Tinto, H. Cairns, M. Kuepfer, I. Milligan, P. Ouedraogo, JB. Doumbo, O. Chandramohan, D. 2017. Seasonal vaccination against malaria: a potential use for an imperfect malaria vaccine. *Malaria Journal*. 1:182.

Guerrant, RL. Brush, J. Ravdin, JI. Sullivan, JA. Mandell, GL. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorpho-nuclear neutrophils. *Journal of Infectious Diseases* 143: 83-93.

Guo, X. Barroso, L. Lysterly, DM. Petri, WA Jr. Houpt, ER. 2011. CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*. 4:772-7.

Guo, X. Barroso, L. Lysterly, DM. Petri WA Jr. Houpt, ER. CD4+ and CD8+ T cell and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*. 4:772-7.

Gupta, S. Naik, S. Naik, SR. 1999. Vaccine potential of 56-66 kDa protease secreted by *Entamoeba histolytica*. *Indian Journal Medical Research*. 109:141-6.

Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, Swaminathan S, Khanna N, Tisminetzky S, Rinas U. 2010. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cells factories*. 9:31.

Guzzo, CM. Yang, DCH. 2007. Systematic analysis of fusion and affinity tags using human aspartyl-tRNA synthetase expressed in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. 54:166-175.

Hanley, KA. 2011. The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution*. 4:635-643.

Haque, R. Ali, IM. Sack, RB. Farr, BM. Ramakrishnan, G. Petri, WA Jr. 2001. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious disease*. 183:1787-93.

Haque, R. Huston, CD. Hughes, M. Houpt, E. Petri, WA Jr. 2003. Amebiasis. *The New England Journal of Medicine*. 16:1565-73.

Haque, R. Huston, CD. Hughes, M. Houpt, E. Petri, WA Jr. 2003. Amebiasis. *The New England Journal of Medicine*. 348:1565-73.

Haque, R. Mollah, NU. Ali, IK. Alam, K. EubaNks, A. Lyerly, D. Petri, WA. Jr. 2000. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:3235-323.

Haque, R. Mondal, D. Shu, J. Roy, S. Kabir, M. Davis, AN. 2007. Correlation of interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76:340-4.

Hecht, O. Van Nuland, NA. Schleinkofer, F. Dingley, AJ. Bruhn, H. Leippe, M. Grotzinger, J. 2004. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*. 279:17834-17841.

Helk, E. Bernin, H. Ernst, T. Ittrich, H. Jacobs, T. Heeren, J. Tacke, F. Tannich, E. Lotter, H. 2013. TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathogens*. 9:e1003096.

Hermosilla, C. Caro, TM. Silva, LM. Ruiz, A. Taubert, A. 2014. The intriguing host innate immune response: novel antiparasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology*. 11:1489–1498.

Hickey, MJ. Kubes, P. 2009. Intravascular immunity: the host pathogen encounter in blood vessels. *Nature Reviews of Immunology*. 5:364-75.

Hien, BTT. Trang, T. Scheutz, F. Cam, PD. Mølbak, K. Dalsgaard, A. 2007. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and other causes of childhood diarrhoea: a case-control study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. *Journal of Medical Microbiology*. 56:1086-96.

Hoebe, K. Janssen, E. Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 5: 971-974.

Hoebe, K. Janssen. E. Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 5:971-974.

- Huang, C. Chien, MS. Hu, CM. Chen, CW. Hsieh, PC. 2006. Secreted expression of the classical swine fever virus glycoprotein Erns in yeast and application to a sandwich blocking ELISA. *Journal of Virological Methods*. 132:40-47.
- Huston, CD. Boettner, DR. Miller-Sims, V. Petri, WA Jr. 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 71:964-72.
- Jarillo-Luna, RA. Campos-Rodriguez, R. Tsutsumi, V. 2002. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Parasitology*. 1:40–56.
- Jeckel, S. Huber, E. Stubenrauch, F. Iftner, T. 2002. A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus E2 is essential for tumor induction in rabbits. *Journal of Virology*. 76:11209–11215.
- Jiménez-Delgadillo, B. Chaudhuri, PP. Baylón-Pacheco, L. López-Monteon, A. Talamás-Rohana, P. Rosales-Encina, JL. 2004. *Entamoeba histolytica*: cDNAs cloned as 30 kDa collagen-binding proteins (CBP) belong to an antioxidant molecule family. Protection of hamsters from amoebic liver abscess by immunization with recombinant CBP. *Parasitology*. 108:7-17.
- Jinno, Y. Ogata, M. Chaudhary, VK. Willingham, MC. Adhya, S. FitzGerald, D. Pastan, I. 1989. Domain II mutants of *Pseudomonas* exotoxin deficient in translocation. 27:15953-9.
- Jinno, Y. Ogata, M. Chaudhary, VK. Willingham, MC. Adhya, S. FitzGerald, D. Pastan I. 1989. Domain II mutants of *Pseudomonas exotoxin* deficient in translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 264:15953-9.
- Johansson-Lindbom, B. Agace, WW. 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunology Review*. 215:226–242.
- Jordan, IK. Henze, K. Fedorova, ND. Koonin, EV. Galperin, MY. 2003. Phylogenomic analysis of the *Giardia intestinalis* transcarboxylase reveals multiple instances of domain fusion and fission in the evolution of biotin-dependent enzymes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 5:172-189.
- Kammanadiminti, S. Mann, BJ. Dutil, L. Chadee, K. 2003. Regulation of toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *The FASEB Journal*. 8:155-157.

- Kammanadiminti, SJ. Dey, I. Chadee, K. 2007. Induction of monocyte chemotactic protein-1 in colonic epithelial cells by *Entamoeba histolytica* is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/p65 pathway. *Infection and Immunity*. 75:1765-1770.
- Kapsenberg, ML. Bos, JD. 1998. Skin, contribution to immunity. *Encyclopedia of immunology*. Academic. 350.
- Katz, U. Ankri, S. Stolarsky, T. Nuchamowitz, Y. Mirelman, D. 2002. *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. *Molecular Biology of the Cell*. 13:4256-4265.
- Kaur, U. Khurana, S. Saikia, UN. Dubey, ML. 2013. Immunogenicity and protective efficacy of heparan sulphate binding proteins of *Entamoeba histolytica* in a guinea pig model of intestinal amoebiasis. *Parasitology*. 3:486-96.
- Keller-Stanislawski, B. Englund, JA. Kang, G. Mangtani, P. Neuzil. K. Nohynek, H. Pless, R. Lambach, P. Zuber, P. 2014. Safety of immunization during pregnancy: A review of the evidence of selected inactivated and live attenuated vaccines. *Vaccine*. 52:7057-64.
- Kelsall, BL. Ravdin, JI. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *Journal Infected Disease*. 168:1319–22.
- Kett, K. Brandtzaeg, P. Radl, J. Haaijman, JJ. 1986. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *Journal of Immunology*. 136:3631–3635.
- Kim, YG. 2017. Microbiota Influences Vaccine and Mucosal Adjuvant Efficacy. *Immune Network*. 17:20-24.
- Kissenpfennig, A. Malissen, B. 2006. Langerhans cells-revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunology*. 27:132–139.
- Kumar, H. Kawai, T. Akira, S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Review of Immunology*. 30:16–34.
- Kumar, V. Sharma, A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. 11:1325–1334.

-
- Kurstak E. 2003. Towards the new global vaccinology era in prevention and control of diseases. *Vaccine*. 21:580-1.
- Lahariya, CA. 2014. A brief history of vaccines and vaccination in India. *Indian Journal of Medicine Research*. 139:491–511.
- Lamm, ME. 1998. Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *American Journal of Physiology*. 274:G614-7.
- Lauwaet, T. Oliveira, M. De Bruyne, G. Bruchhaus, I. Duchene, M. Mareel, M. Leroy, A. 2004. *Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. *International Journal for Parasitology*. 34:549–556.
- Lawson, LB. Clements, JD. Freytag, LC. 2010. Mucosal Immune Responses Induced by Transcutaneous Vaccines. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 34:19-37.
- Leenaars, P. Koedamm, M. Westerm, P. Baumansm, V. Claassen, E. Hendriksen, C.F. 1998. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/ antigen combinations in rabbits and mice. *Laboratory Animals*. 32:387-406.
- Leippe M. 1997. Amoebapores. *Parasitol Today* 13:178-183.
- Leippe, M. Bruhn, H. Hecht, O. Grotzinger, J. 2005. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in Parasitology*. 21:5-7.
- Leitsch, D. Kolarich, D. Wilson, IB. Altmann, F. Duchene, M. 2007. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PloS Biology*. 8:e211.
- Leon-Avila, G. Tovar, J. 2004. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology*. 50:1245-50.
- Leroy, A. De Bruyne, G. Mareel, M. Nokkaew, C. Bailey, G. Nelis, H. 1995. Contactdependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infection and Immunity*. 63:4253-4260.
- Liao, CW. Chen, CA. Lee, CN. Su, YN. Chang, MC. Syu, MH. Hsieh, CY. Cheng, WF. 2005. Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic response and antitumor effects. *Cancer Research*. 65:9089-9098.

- Lidell, ME. Moncada, D. Chadee, K. Hansson, GC. 2006. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 103:9298-303.
- Lin, JY. Chadee, K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from l-arginine. Journal of Immunology. 148:3999-4005.
- Lindell, ME. Moncada, DM. Chadee, K. Hansson, GC. 2006. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proceedings of the National Academy of USA. 24:9298-303.
- Lopez-Osuna, M. Arellano, J. Kretschmer, R. 1992. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. Parasite Immunology. 6:79-586.
- Lotter, H. Gonzalez-Roldan, N. Lindner, B. Winau, F. Isibasi, A. Moreno-Lafont, M. Ulmer, AJ. Holst, O. Tannich, E. Jacobs, T. 2009. Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. PLoS Pathogens. 5:e1000434.
- Lotter, H. Zhang, T. Seydel, KB. Stanley, SL. Jr. 1997. Tannich E. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibodymediated protection against invasive amebiasis. Journal of Experimental Medicine. 185:1793-801.
- Lotter, H. Zhang, T. Seydel, KB. Stanley, SL. Jr. 1997. Tannich E. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibodymediated protection against invasive amebiasis. Journal of Experimental Medicine. 185:1793-801.
- Lotus, B. Anderson, I. Davies, R. Alsmark, UC. Samuelson, J. Amedo, 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. Bhattachary, A. Chillingworth, T. Churcher, C. Hance, Z. Harris, B. Harris, D. Jagels, K. Moule, S. Mungall, K. Ormond, D. Squares, R. Whitehead, S. Quail, MA. Rabbinowitsch, E. Norbertczak, H. Price, C. Wang, Z. Guillen, N. Gilchrist, C. Stroup, SE. Bhattachary, 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. 433:865-8.

- Ludlum, D. Colinas, R.J. Kirk, MC. Mehta, JR. 1988. Reaction of reduced metronidazole with guanosine to form an unstable adduct. *Carcinogenesis* 9:593-596.
- Ludvik, J. Shipstone, A.C. 1970. The Ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. *Bulletin of the World Health organization*. 43:301-8.
- Ma, JK. Drake, PM. Christou. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*.10:794-805.
- Macauley-Patrick, S. Fazenda, ML. McNeil, B. Harvey, LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22:249-70.
- Macpherson, AJ. McCoy, KD. Johansen, F. Brandtzaeg, P. 2008. The immune geog-raphy of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*. 1:11-22.
- Madsen, KL. Malfair, D. Gray, D. Doyle, JS. Jewell, LD. Fedorak, RN. 1999. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflammatory Bowel Disease*. 5:262-70.
- Maldonado-Bernal, C. Kirschning, CJ. Rosenstein, Y. Rocha, LM. Rios-Sarabia, N. Espinosa-Cantellano, M. Becker, I. Salazar-Gonzalez, R.M. 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 Immunology*. 2:127-137.
- Mann, B.J. Lockhart, L.A. 1998. Molecular analysis of the Galy GalNAc adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2:13S-16S.
- Mann, B.J. Torian, J.B.E. Vedvick, T.S. Petri, W.A. Jr. 1991. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proceeding of the National Academi Science of U.S.A.* 8:3248-5.
- Mann, BJ. Burkholder, BV. Lockhart, LA. 1997. Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* ex-pressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine*. 15: 659-63.
- Martínez-López, C. Orozco, E. Sánchez, T. García-Pérez, R.M. Hernández- Hernández, F. Rodríguez, M.A. 2004. The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and

liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell. Microbiology*. 6:367-376.

Mayer-Scholl, A. Averhoff, P. Zychlinsky, A. 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*. 1:62–66.

McCarthy, H. Ottensmeier, CH. Hamblin, TJ. Stevenson, FK. 2003. Anti-idiotypic vaccines. Review. *British Journal Haematology*. 5:770-81.

McCoy, J. J. Mann, B. J. Petri, W. A Jr. 1994. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*, or how lectins let parasites stick around. *Infection and Immunity*. 62:3045-3050.

McSorley, SJ. 2014. Immunity to intestinal pathogens: lessons learned from *Salmonella*. *Immunological Review*. 1:168-82.

Medina, E. Guzmán, A. 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*. 19:1573-80.

Meneses-Ruiz, DM. Laclette, JP. Aguilar-Díaz, H. Hernández-Ruiz, J. Luz Madrigal, A. Sampieri, A. Vaca, L. Carrero, JC. 2011. Mucosal Delivery of ACNPV Baculovirus Driving Expression of the Gal-Lectin LC3 Fragment Confers Protection against Amoebic Liver Abscess in Hamster. *International Journal of Biological Science*. 9:1345-56.

Meyers, C. Harry, J. Lin, YL. Wettstein, FO. 1992. Identification of three transforming proteins encoded by cottontail rabbit papillomavirus. *Journal of Virology*. 66:1655-1664.

Meza, I. Torres, H. Meraz, A. 1994. Organización Molecular de *Entamoeba histolytica*. En. *Amibiasis, Infección y Enfermedad por Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, México. pp. 39-55.

Mi-Ichi, F. Yoshida, H. Hamanos, S. 2016. *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PloS Pathogens*.12:e1005845.

Moncada, D. Keller, K. Chadee, K. 2005. *Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and Immunity*. 73:3790-3.

Mondal, D. Haque, R. Sack, RB. Kirkpatrick, BD. Petri, WA Jr. 2009. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80:824-6.

- Moonah, SN. Jiang, NM. Petri, WA Jr. 2013. Host immune response to intestinal amebiasis. *PLoS Pathogens*. 9:8.
- Mora JR, Iwata, M. Eksteen, B. Song, SY. Jun, T. Senma, B. 2006. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*. 314:1157-1160.
- Moradali, MF. Ghods, S. Rehm. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7:39.
- Moreno S, Docampo R (1985) Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environ Health Perspect* 64: 199–208.
- Morens, DM. Folkers, GK. Fauci, AS. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 430: 242-9.
- Mortimer, L. Chadee, K. 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*. 3:366-80.
- Mostov, K. Su, T. ter Beest, M. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature Cell Biology*. 5:287-93.
- Muller M (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93: 165–171.
- Muller, M. 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology*. 42:465-488.
- Nakada-Tsukui, K. Nozaki, T. 2016. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*. 7:175.
- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*. 6:173–182.
- Nosedá, DG. Blasco, M. Recupero, M. Galvagno, MA. 2014. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*. 104:85-91.
- Pacheco-Yepez, J. Rivera-Aguilar, V. Barbosa-Cabrera, E. Rojas-Hernandez, S. Jarillo-Luna, RA. Campos-Rodríguez, R. 2011. Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunology*. 5:255–264.

- Pandey, A. Cabello, A. Akoolo, L. Riece-Ficht, A. Arenas-Gamboa, A. McMurray, D. Ficht, TA. De Fogueired, P. 2016. The Case for Live Attenuated Vaccines against the Neglected Zoonotic Diseases Brucellosis and Bovine Tuberculosis. *PLoS Neglected Tropical disease*. 8:e0004572.
- Paoletti, LC. Rench, MA. Kasper, DL. Molrine, D. Ambrosino, D. Baker, CJ. 2001. Effects of alum adjuvant or a booster dose on immunogenicity during clinical trials of group B streptococcal type iii conjugate vaccines. *Infection and Immunity*. 69:6696-701.
- Papayannopoulos, V. Zychlinsky, A. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*. 11:513–521.
- Pasetti, MF. Simon, J.K, Sztejn, MB. Levine, MM. 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunology Review*. 239:125-48.
- Paulnock, DM. 1994. The molecular biology of macrophage activation in Macrophage-pathogen interactions. 47–62.
- Pelham, HR. 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends biochemical sciences*. 12:483-6.
- Peterson, DA. McNulty, NP. Guruge, JL. Gordon, JI. 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe*. 2:328-39.
- Petri, WA Jr. Chapman, MD. Snodgrass, T. Mann, BJ. Broman, J. Ravdin, JI. 1989. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal in Biological Chemistry*. 264:3007-12.
- 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*. *Annual Review Microbiology*. 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*. *Infection and Immunity*. 59:7–101.
- Plotkin, S. Orenstein, W. Offit, P. 2013. Vaccines, 5th edn. In *Fundamental Immunology*. 43:1032-1068.

- Plotkin, SA. Orenstein, W. Offit, PA. 2013. Vaccines. 6th ed. Philadelphia: Saunders. 1141–96.
- Powell, SJ. MacLeod, I. Wilmot, AJ. Elsdon-Dew, R. 1999. Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. *Lancet*. 7477:1329-31.
- Prathap, K. Gilman, R. 1970. The histopathology of acute intestinal amebiasis. *American Journal of Pathology*. 60:229–246.
- Prathap, K., Gilman, R., 1970. The histopathology. *American Journal of pathology*. 2: 229–246.
- Prior, TI. FitzGerald, DJ. Pastan, I. 1992. Translocation mediated by domain II of *Pseudomonas* exotoxin A: transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry*. 31:3555-9.
- Pulendran, B. Ahmed, R. 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*. 12:509-517.
- Quach, J. St-Pierre, J. Chadee, K. 2014. The future for vaccine development against *Entamoeba histolytica*. *Human vaccin immunotherapeutics*. 10:1514-21.
- Que, X. Reed, SL. 2000. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiol Review*. 13:196-206.
- Ragland, BD. Ashley, LS. Vaux, DL. Petri, WA Jr. 1994. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Experimental Parasitology*. 79:460-7.
- Ralston, KS. Petri, WA Jr. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*. 6:254-63.
- Ravdin, JI. Croft, BY. Guerrant, RL. 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba*
- Ravdin, JI. Guerrant, RL. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *Journal of clinical investigation*. 68:1305-1313.
- Ravdin, JI. Moreau, F. Sullivan, JA. Petri WA Jr. Mandell, GL. 1988. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 56:1505–1512.

- Ravdin, JI. Sperelakis, N. Guerrant, SL. 1982. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infected diseases*. 146:335-340.
- Raykhel, I. Alanen, H. Salo, K. Jurvansuu, J. Nguyen, VD. Latva-Ranta, M. Ruddock, L. 2007. A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *Journal Cell Biology*. 179:1193-204.
- Reed, SL. Ember, JA. Herdman, DS. DiScipio, RG. Hugli, TE. Gigli, I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *Journal of Immunology*. 155:266-74.
- Riahi, Y. Simon-Tov, R. Ankri, S. 2004. Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase inhibitor gene from *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2:153-62.
- Rigothier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillen N: Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun* 70:3208–3215.
- Ruiz, PA. Shkoda, A. Kim, SC. Sartor, RB. Haller, D. 2005. IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *Journal of Immunology*.174:2990–9.
- Ruiz-Palacios, GM. Pérez-Schael, I. Velázquez, R. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 354:11-22.
- Rupnow, MF. Chang, AH. Shachter, RD. Owens, DK. Parsonnet, J. 2009. Cost-effectiveness of a potential prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine in the United States. *Journal of Infectious Disease*. 8:311-1317.
- Sadhukhan, R. Sen, I.1996. Different glycosylation requirements for the synthesis of enzymatically active angiotensin-converting enzyme in mammalian cells and yeast. *Journal Biological Chemistry*. 271:6429-6434.

- Salata, RA. Martinez-Palomo A. Murray, HW. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology*. 7:2633–2639.
- Salata, RA. Ravdin, JI. 1986. Interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* and increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. *Journal of Infectious Diseases* 154:19-26.
- Salleras, L. 2002. Tecnologías de Producción de Vacunas II: Vacunas inactivadas. *Vacunas* 3:78-84.
- Sallese, M. Giannotta, M. Luini, A. 2009. Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 20:801-9.
- Sallusto, F. Geginat, J. Lanzavecchia, A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 22:745–763.
- Samuel, L. Stanley, JR. 1997. Progress towards Development of a Vaccine for Amebiasis. *Clinical Microbiology Review*. 4: 637–649.
- Samuelson, J. Bushkin, GG. Chatterjee, A. Robbins, PW. 2013. Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. *Eukaryotic Cell*.12:1578-87.
- Santana, C. Anjo, SI. Manadas, B. 2016. Protein precipitation of diluted samples in SDS-containing buffer with acetone leads to higher protein recovery and reproducibility in comparison with TCA/acetone approach. *Proteomics*. 13:1847-51.
- Satoh-Takayama, N. Vosshenrich, C. Lesjean-Pottier, S. Sawa, S. Lochner, M. Rattis, F. Mention, J. Thiam, K. Cerf-Bensussan, N. Mandelboim, O. Eberl, G. Di Santo, J. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*. 29:958-70.
- Schain, DC. Salata, RA. Ravdin, JI. 1992. Human T-lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactose-inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 60:2143–2146.
- Schmidt, FR. 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:363-372.

- Segal, AW. 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 6: 604–618.
- Séguin, 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. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*. 92:12175-79.
- 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. *Infection and Immunity*. 65:2522–2527.
- Séguin, 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. *Infection and Immun*. 65:2522-2527.
- Seigrest, C. 2013. In: *Vaccine immunology*. 6th ed. Plotkins SA, Orenstein W, Offit PA, editors. Vaccines. Philadelphia: Saunders. 14-32.
- Seydel, KB. Li, E. Swanson, P. Stanley, S.L. 1997. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse–human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*. 65:1631-1639.
- Seydel, KB. Li, E. Zhang, Z. Stanley, S.L. 1998. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. *Gastroenterology*. 115:1446-1453.
- Shearman, DJ. Parkin, DM. McClelland, DB. 1972. The demonstration and function of antibodies in the gastrointestinal tract. *Gut*. 6:483–499.
- Shi, N. Li, N. Duan, X. Niu, H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*. 4:14.
- Shibayama, M. Rivera-Aguilar, V. Barbosa-Cabrera, E. Rojas-Hernandez, S. Jarillo-Luna, A. Tsutsumi, V. Pacheco-Yepez, J. Campos-Rodriguez, R. 2008. Innate immunity prevents tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*. 54:1032-1042.

- Siegall, CB. Ogata, M. Pastan, I. FitzGerald, DJ. 1991. Analysis of sequences in domain II of *Pseudomonas* exotoxin A, which mediate translocation. *Biochemistry*. 30:7154-7159.
- Silva, PP. Martínez-Palomo, A. González-Robles, A. 1975. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface. *Journal of Cellular Biology*. 64:538.
- Sim, S. Park, SJ. Yong, TS. Im, KI. Shin, MH. 2007. Involvement of beta2-integrin in ROS mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes and Infection*. 11: 1368-75.
- Soloff, AC. Barratt-Boyes, SM. 2010. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens. *Cell Research*. 8:872–885
- Soong, CJ. Kain, KC. Abd-Alla, M. Jackson, TF. Ravdin JI. 1995. A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin is efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess. *Journal of infectious diseases*. 3:645-51.
- Soong, CJ. Torian, BE. Abd-Alla, MD. Jackson, TF. Gatharim, V. Ravdin, JI. 1995. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infection and Immunity*. 63:472–477.
- Spetz, AL. Strominger, J. Groh-Spies, V. 1996. T Cell subsets in normal human epidermis. *American Journal Pathology*. 149:665–674.
- Stanley, SL Jr. 2006. Vaccines for amoebiasis: barriers and opportunities. *Parasitology*. 133:81-6.
- Stanley, SL Jr. 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. *Journal of biological chemistry*. 24:270-8.
- Stanley, SL. Jr. Tian, K. Koester, JP. Li, E. 1995. The serinerich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *Journal of Biological Chemestri*. 270:4121-6.
- Stauffer, W. Abd-Alla, M. Ravdin, JI. 2006. Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. 2:266-9.

- Stills, Jr. HF. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal*. 46:280–293.
- Tang, DC. Shi, Z. Curiel, DT.1997. Vaccination onto bare skin. *Nature*. 388:729–730.
- Tebeje BM Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP. 2016. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites and vectors*.1:528.
- Thibeaux, R. Avé, P. Bernier, M. Morcelet, M. Frileux, P. Guillén, N. Labruyere, E. 2014.The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature Communication*. 5:5142.
- Thibeaux, R. Weber, C. Hon, CC. Dillies, MA. Avé, P. Coppée, JY. Labruyere, E. Gullen, N. 2013. Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. *PLoS Pathogens*. 9:e1003824.
- Tran, VQ. Herdman, S. Torian, BE. Reed, SL. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *Journal of Infection Diseases*. 177:508-11.
- Tregnaghi, M. 2002. Presente y futuro de las vacunas. *Sociedad Argentina pediátrica*. 100:1
- Tsutsumi, V. Martinez-Palomo, A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology*. 1:112–119.
- Tsutsumi, V. Mena-Lopez, R. Anaya-Velazquez, F. Martinez-Palomo, A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*. 117:81-91.
- Upcroft, P. Upcroft, JA. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinal Microbiology Review*. 14:150–164.
- Vaz, PK. Hartley, CA. Browing, GF. Devlin, JM. 2015. Marsupial and monotrema serum immunoglobulin binding by proteins A, G and L and anti-kangaroo antibody. *Journal Immunology Methods*. 427:94-9.
- Velázquez J. R, Llaguno, P. Fernández-Diéz J. Pérez-Rodríguez, M. Arellano, J. Lopez-Osuna, M. Kretschmer, RR. 1995. Antigen induced eosinophilia protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amebic abscess of the liver. *Archives of Medical Research*. 26:S93-S98.

- Ventura-Juárez, J. Campos-Rodríguez, R. Jarillo-Luna, R.A. Muñoz-Fernández, L. Escario-G-Trevijano, J.A. Pérez-Serrano, J. Quintanar, J.L. Salinas, E. Villalobos-Gómez, F.R. 2009. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. *Parasitology Research*. 4:821-6.
- Vivanco-Cid, H. Alpuche, C. Wong, I. Rocha, L. Rios, N, Estrada, I Villasis, M. López, C. Isibasi A. 2007. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Source Parasite Immunology*. 9:467-74.
- Vogel, FR. Alving, CR. 2002. Progress in immunologic adjuvant development. *The Jordan Report*. 39-42.
- Walwyn, SV. Iglesias DM. Almarales, MR. Acosta, TN. Mera, AF. Cabrejas, AM. 2004. Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. *Revista Cubana de Medicina Militar*. ISSN 1561-3046.
- Wang, L. Bursch, LS. Kissenpfennig, A. Malissen, B. Jameson, SC. Hogquist, KA. 2008. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *Journal of Immunology*. 180:4722-4727.
- Warger, T. Schild, H. Rechsteiner, G. 2007. Initiation of adaptive immune responses by transcutaneous immunization. *Immunology Letters*. 109:13-20.
- Weldon, JE. Pastan, I. 2011. A guide to taming a toxin: recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cáncer. *Journal FEBS*. 23:4683-4700.
- West, SB. Wislocki, PG. Fiorentini, KM. Alvaro, R. Wolf, FJ. Lu AY. 1982. Drug residue formation from ronidazole, a 5-nitroimidazole. I. Characterization of in vitro protein alkylation. *Chemico Biological Interaction* 41:265-279.
- West, SB. Wislocki, PG. Wolf, FJ. Lu, AYH. 1982. Drug residue formation from ronidazole, a 5-nitroimidazole. II. Involvement of microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase in protein alkylation *in vitro*. *Chemico Biological Interaction*. 41:281–296.
- WHO. 1997. Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec*. 72:97-9.
- WHO. 2004. Progress towards global poliomyelitis eradication: preparation for the oral poliovirus vaccine cessation era. *Releve Epidemiologique hebdomadaire*. 79:349-55.

- WHO. 2008. Global Polio Eradication Initiative Report, Tech. Rep., World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Williams, IR. Kupper, TS. 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Science*. 58:1485–1507.
- Wilson, MS. Mentink-Kane, MM. Pesce, JT. Ramalingam, TR. Thompson, R. Wynn, TA. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and Cell Biology*. 85:148-54.
- World Health Organization. 2007. Model List of Essential Medicines, 15th edition. Available: <http://www.who.int/medicines/publications/EssMedList15.pdf>.
- World Health Organization. 2009. State of the World's Vaccines and Immunization. World Health Organization (WHO), UNICEF, World Bank. 5-210.
- Ximénez, C. Morán, P. Ramos, F. 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna México*. 23:398-407.
- Ximénez, C. Morán, P. Rojas, L. Valadez, A. Gómez, A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infections Genetic and Evolution*. 6:1023-32.
- Xu, W. Shen, Y. Jiang, Z. Wang, Y. Chu, Y. Xiong, S. 2004. Intranasal delivery of chitosan DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection. *Vaccine*. 22: 3603-3612.
- Yoshida, M. Claypool, SM. Wagner, JS. Mizoguchi, E. Mizoguchi, A. Roopenian, DC. Lencer, WI. Blumberg, RS. 2004. Human neonatal fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*. 6:769-783.
- Young, B. O'Dowd, G. Woodford, P. 2006. Wheater's functional histology. Elsevier, Philadelphia, 464.
- Yu, RC. Abrams, DC. Alaibac, M. 1994. Morphological and quantitative analyses of normal epidermal Langerhans cells using confocal scanning laser microscopy. *British Journal Dermatology*. 131:843–848.
- Zaman, M. Toth, I. 2013. Immunostimulation by Synthetic Lipopeptide-Based Vaccine Candidates: Structure-Activity Relationships. *Frontiers in immunology*. 4:318.

-
- Zhang, T. Cieslak, PR. Stanley, SL Jr. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infection and Immunity*. 62:1166-70.
- 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*. *Infection and immunity*. 6:2605-8.
- Zheng, Y. Valdez, PA. Danilenko, DM. Hu, Y. Sa, SM. Gong, Q. Abbas, AR. Modrusan, Z. Ghilardi, N. de Sauvage, FJ. Ouyang, W. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine*. 14:282-9.
- Zhou, P. Streutker, C. Borojevic, R. Wang, Y. Croitoru, K. 2004. IL-10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy. *American Journal of Physiology*. 287:G599–604.

9. ANEXO A.

MEDIOS DE CULTIVO

****A.1: Para bacterias (TOP10 o DH5 α)****

- **A.1.1: Medio de cultivo LB (Luria Bertani) caldo**

0.5% de Extracto de Levadura, 1% de peptona de caseína, 0.5% de NaCl.

- **A.1.2: Medio de cultivo LB (Luria Bertani) agar**

0.5% de Extracto de Levadura, 1% de peptona de caseína, 0.5% de NaCl, 1.3% de agar bacteriológico.

Nota: si se requiere la adición de ampicilina se agrega 1 μ l/ml a una concentración de (100 μ g/ml)

****A.2: Para levaduras (*Pichia pastoris*)****

- **A.2.1: Medio de cultivo YPD**

1% de Extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa.

- **A.2.2: Medio de cultivo YPG**

1% de Extracto de levadura, 2% de peptona, 2% glicerol.

- **A.2.3: Medio de cultivo MD (1 L)**

1.34% YNB, 4 \times 10⁻⁵ % biotin, 2% dextrosa.

Preparación: esterilice el de agua durante 20 minutos, una vez finalizado el proceso deje enfriar y adicione:

100 ml de YNB 10X

2 ml de biotina 500X

100 ml de Dextrosa 10X

NOTA: El YNB, la biotina y la dextrosa se esterilizan por filtración.

- **A.2.4: Medio de cultivo BMMY (1L)**

1% Extracto de levadura

2% Peptona

100 mM Fosfato de potasio monobásico, pH 6.0

1.34% YNB

$4 \times 10^{-5}\%$ Biotina

0.5% metanol

Preparación: disolver el extracto de levadura y la peptona en agua destilada y esterilice, una vez terminado el proceso deje enfriar y adicione:

100 mL 1 M Fosfato de potasio monobásico, pH 6.0

100 mL YNB 10X

2 mL Biotina 500X

NOTA: El metanol se adiciona al final

- **A.2.5: Medio de cultivo BMMG (1 L)**

1% Extracto de levadura

2% Peptona

100 mM Fosfato de potasio monobásico, pH 6.0

1.34% YNB

4 × 10⁻⁵% Biotina

1% de glicerol

Preparación: disolver el extracto de levadura y la peptona en agua destilada y esterilice, una vez terminado el proceso deje enfriar y adicione:

100 mL 1 M Fosfato de potasio monobásico, pH 6.0

100 mL YNB 10X

2 mL Biotina 500X

- **A.2.6: Medio de cultivo mínimo definido (biorreactor) (1 L)**
- Fosfato de Potasio monobásico: 42.9 gr
- Sulfato de magnesio: 11.7 9r
- Sulfato de calcio: 1.0 gr
- Sulfato de potasio: 14.3 gr
- Sulfato de amonio: 5.0 gr
- Glicerol: 40 gr

ANEXO B.**SOLUCIONES**

- **B.1: Buffers empleados para la extracción de plásmidos por el método**

Birnboim y Doly (1979)

Birnboim I: Tris HCL 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0), glucosa 50 mM (esterilizar y almacenar a 4°C)

Birnboim II: NaOH 0.2 N, y SDS 1% (cuando se utiliza en la extracción de AND se prepara 1:1)

Birnboim III: 60 ml de acetato de potasio al 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua destilada.

- **B.2: Buffers empleados para la extracción de ADN genómico TSNT**

TSNT: Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0)

TE 1X: EDTA 100mM, Tris-HCl 1 M.

ANEXO C.

PROTOCOLOS

- **C.1: Preparación de Células Calcio Competentes:**

Se cultiva *E. coli* en medio LB sólido a 37°C durante 20 hrs. Se toma una colonia aislada y se siembra en 3 ml de medio LB líquido, se incubó con agitación a 37°C durante 20 hrs. Posteriormente se siembra 1 ml del cultivo crecido en 50 ml de LB líquido y se incuba durante 3 h aproximadamente. Después de la incubación las células se colocan en hielo durante 10 min, después se centrifugan a 13 000 rpm durante 5 min y se elimina el sobrenadante, la pastilla se resuspende con cuidado en 3 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril y frío, los tubos se incuban en hielo 1 h y nuevamente se centrifugaron a 12 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y la pastilla nuevamente se re suspende en 500 µl de CaCl₂ 0.1 M estéril y frío. Se toma un volumen de 50 o 100 µl de células para la transformación.

NOTA: las células pueden ser preparadas un día antes de la transformación, si esta se va a realizar dos días o una semana después la transformación, se realiza lo siguiente: Por la pastilla se resuspende en 30 µl de CaCl₂ 0.1 M con DMSO al 7% y se almacenan hasta su uso a -70°C

- **C.2: Preparación de Células Electrocompetentes:**

Se toma una colonia de *P. pastoris* GS115, la cual se cultiva en 200 ml de medio YPD a 30°C y en agitación, posteriormente las levaduras se colocan en hielo durante 10 min y se centrifugan a 6 000 rpm a 4°C durante 7 min. El sobrenadante se descarta y las células se lavan con 10 ml de agua destilada fría y estéril y se centrifugan a 6 000 rpm a 4°C durante

7 min (este paso se repite 3 veces). Una vez obtenido el pellet de células este se resuspende en 10 ml de glicerol al 10% frío y estéril y se centrifugan a 6 000 rpm a 4°C durante 7 min (este paso se repite 2 veces) el sobrenadante se descarta, las levaduras se resuspenden en 1 ml de glicerol al 10%. Por último las levaduras se almacenan en alícuotas de 80 µl a -80°C.

- **C.3: Transformación genética bacteriana por choque térmico**

Se toman aproximadamente 50 ng del ADN, este se adiciona a 30 o 50 µl de células competentes de *E. coli* mezclando suavemente, la muestra se incuba en hielo durante 1 h, después se someten a choque térmico con las siguientes condiciones: 42°C por 60 a 90 seg, hielo 1 min, después se añaden 500 µl de medio LB líquido y se incuban a 37°C durante 45 min con agitación. Posteriormente las bacterias se siembran en cajas con medio sólido LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y se incuban a 37°C toda la noche. Las colonias crecidas en el medio de selección son las bacterias presuntamente transformadas.

- **C.4: Extracción de ADN por el método de Birnboim y Doly (1979)**

Las colonias de *E. coli* DH5 obtenidas del proceso de transformación se cultivan nuevamente a 37°C en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante 24 h. Posteriormente de este cultivo se toman 2 ml y se centrifuga a 12 000 rpm por 3 min, se elimina el sobrenadante y se añaden 200 µl de la solución Birnboim I, se resuspende la pastilla y después se añaden 200 µl de solución Birnboim II preparada en el momento, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se agrega 150 µl de solución Birnboim III, se mezcla vigorosamente y se incuba en hielo 5 min para después centrifugar a 12 000 rpm por 5 min y transferir el sobrenadante a otro tubo

limpio. Se añaden 200 μ l de fenol-cloroformo y se mezcló vigorosamente hasta emulsificar, se centrifuga a 12 000 rpm durante 5 min, se recupera fase acuosa y se adicionan 200 μ l de cloroformo-álcool isoamílico, se agita hasta emulsificar y se centrifuga 5 min. Se recupera la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitan con un volumen de isopropanol. Se mezcla por inversión durante 1 min y posteriormente se deja en hielo. Se recupera la pastilla por centrifugación a 12 000 rpm, se da un lavado de etanol al 70%. Se centrifuga 5 min a 12 000 rpm, se elimina el sobrenadante, y la pastilla se resuspende con agua libre de nucleasas y se almacena a -20°C .

- **C.5: Extracción de ADN por el método de TSNT**

Se toman las colonias de levaduras crecidas en el medio de selección (medio MD), posteriormente se ponen a crecer en medio YPD a 30°C durante 20 h, una vez crecido el cultivo se toman 2 ml de medio con levadura de cada muestra se centrifuga 1 min a 12000 rpm y se elimina el sobrenadante, se agrega 200 μ l de TSNT y se mezcla en vortex 30 seg, se agregan 400 μ l de fenol-cloroformo-álcool isoamílico y se mezcla nuevamente en vortex 30 seg, posteriormente se agregan 300 μ l de TE 1X y se mezcla en vortex, en seguida se centrifuga 7 min a 13,000 rpm y se recupera la fase acuosa (parte superior del sobrenadante), a esta se le agrega 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío y se centrifuga 10 min a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y se agregan 700 μ l de etanol al 70% frío, se centrifuga 10 min a 13000 rpm y se decanta el sobrenadante, la pastilla obtenida se deja secar para retirar el alcohol restante, posteriormente se resuspende en 50 μ l de agua libre de nucleasas.

- **C.6: Precipitación con Acetona.**

Se toma 1.2 ml de medio de cultivo, posteriormente se agregan 800 μ l de Acetona fría, se mezcla en vortex 20 segundos, se dejan 10 minutos en frío y se centrifuga durante 4 °C en 15 min a 11 000 g . Posteriormente se tira el sobrenadante y se retira la cantidad de acetona que haya quedado en el tubo, se deja secar un poco y después se almacena o se utilizan en el momento.



An anti-amoebic vaccine: generation of the recombinant antigen LC3 from *Entamoeba histolytica* linked to mutated exotoxin A (PE Δ III) via the *Pichia pastoris* system

Sandra Luz Martínez-Hernández · Daniel Cervantes-García · Martín Muñoz-Ortega ·
Liseth R. Aldaba-Muruato · Victor M. Loera-Muro · Jorge A. Ascacio-Martínez ·
María de Jesús Loera-Arias · Roberto Montes de Oca-Luna · Javier Ventura-Juárez

Received: 14 December 2016 / Accepted: 27 April 2017
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

Abstract

Objective To generate an immunogenic chimeric protein containing the *Entamoeba histolytica* LC3 fragment fused to the retrograde delivery domains of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* and KDEL3 for use as an effective vaccine.

Results A codon-optimized synthetic gene encoding the PE Δ III-LC3-KDEL3 fusion construct was designed for expression in *Pichia pastoris*. This transgene was subcloned into the plasmid pPIC9 for methanol-inducible expression. After transformation and selection of positive-transformed clones by PCR, the expression of the recombinant protein PE Δ III-LC3-KDEL3 was elicited. SDS-PAGE, protein glycosylation staining and western blot assays

demonstrated a 67 kDa protein in the medium culture supernatant. The recombinant protein was detected with a polyclonal anti-6X His tag antibody and a polyclonal *E. histolytica*-specific antibody. A specific antibody response was induced in hamsters after immunization with this protein.

Conclusions We report for the first time the design and expression of the recombinant *E. histolytica* LC3 protein fused to PE Δ III and KDEL3, with potential application as an immunogen.

Keywords *Entamoeba histolytica* · Anti-amoebic vaccine · Exotoxin A · KDEL · LC3 · *Pichia pastoris* · Recombinant protein · Vaccine

S. L. Martínez-Hernández · L. R. Aldaba-Muruato ·
J. Ventura-Juárez (✉)
Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av.
Universidad # 940, Ciudad Universitaria,
C. P. 20131 Aguascalientes, AGS, Mexico
e-mail: jventur@correo.uaa.mx

D. Cervantes-García
CONACYT-Departamento de Microbiología, Centro de
Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de
Aguascalientes, Aguascalientes, AGS, Mexico

M. Muñoz-Ortega
Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes,
Aguascalientes, AGS, Mexico

V. M. Loera-Muro
Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de
Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de
Aguascalientes, Aguascalientes, AGS, Mexico

J. A. Ascacio-Martínez
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular,
Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la
Salud y, Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, NL, Mexico

M. de Jesús Loera-Arias · R. M. de Oca-Luna
Departamento de Histología, Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL,
Mexico

Introduction

Entamoeba histolytica is an enteric parasite that can cause amoebiasis after infecting the human large intestine, with symptoms including dysentery and amoebic liver abscesses (Bruckner 1992). A Gal/GalNAc lectin is important for the pathogenic mechanism. The lectin is localized on the surface of the amoeba, and mediates binding to host cells, leading to cell death. It is composed of heavy (170 kDa), intermediate (150 kDa) and light (35/31 kDa) subunits (Petri et al. 2002). The LC3 region, located in the cysteine-rich pseudorepeat domain of the heavy subunit (758–1134), has proven to induce an adherence-inhibitory antibody response as well as to protect against ALA in a gerbil animal model (Soong et al. 1995). Although the Gal/GalNAc lectin or LC3 fragment is a potent immunogen on its own, appropriate adjuvants are needed to elicit a strong immune response. For this purpose, molecular approaches such as retrograde delivery should be explored.

One strategy for the enhancement of antigen presentation and specific responses is the use of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (PE) (Goletz et al. 1997). Of the three domains in PE, domain I is for binding to a cell surface receptor, domain II for translocation to the cytosol, and domain III for the toxic capability of the bacteria. PE lacking domain III (PE Δ III) can deliver foreign proteins into cells through receptor mediated endocytosis, acting as a non-toxic bioadjuvant (Bagdasarian et al. 1999; Weldon and Pastan 2011). Potent cellular and humoral E7-specific immune responses have been achieved by linking domain I-II of PE to the tumor antigen E7 (Liao et al. 2005).

For recombinant protein production, one of the expression systems most frequently utilized is *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) because of its high-yield expression and post-translational modifications, as well as its capacity as a methanol-inducible promoter (Noseda et al. 2014). We herein expressed and purified a recombinant fusion protein with the *E. histolytica* LC3 fragment, the retrograde-delivery domains (I–II) from PE, and the carboxy-terminal signal KDEL3 in the *P. pastoris* expression system. The aim was to develop an efficient immunogenic antigen that may eventually serve as an effective immunogen, with potential application as a vaccine.

Materials and methods

Strains and plasmids

Escherichia coli DH5 α and TOP10, *Pichia pastoris* GS115 (his4), and the expression plasmid pPIC9 were used. The strains of *E. coli* were grown at 37 °C in lysogeny broth medium supplemented with 100 mg ampicillin l⁻¹ when necessary. The yeast strains were grown at 28–30 °C, in either YPD (10 g yeast extract l⁻¹, 20 g peptone l⁻¹ and 20 g dextrose l⁻¹), BMGY (10 g yeast extract l⁻¹, 20 g peptone l⁻¹, 0.1 M potassium phosphate pH 6, 13.4 g yeast nitrogen base l⁻¹, 0.4 mg biotin l⁻¹ and 10 g glycerol l⁻¹), BMMY medium (10 g yeast extract l⁻¹, 20 g peptone l⁻¹, 0.1 M potassium phosphate pH 6, 13.4 g yeast nitrogen base l⁻¹, 0.4 mg biotin l⁻¹ and 0.5% methanol v/v), or MD medium (13.4 g yeast nitrogen base l⁻¹, 20 g dextrose l⁻¹ and 0.4 mg biotin l⁻¹).

Construct engineering of PE Δ III-LC3-KDEL3

For the design of the PE Δ III-LC3-KDEL3 synthetic gene, the nucleotide sequence of PE (GenBank accession No. K01397.1) and that of the encoding fragment LC3 (52 kDa) of the heavy subunit of 170 kDa (Gal-GalNAc) (GenBank accession No. XP_656181) were obtained from the National Center for Biotechnology Information database. The sequence of the LC3 fragment was fused to domains I–II of the PE gene sequence (domain III had been identified and deleted), and then the sequence KKDEL-RDEL-KDEL (KDEL3) was added. The gene sequence PE Δ III-LC3-KDEL3 was established as follows: *Eco*RI, 6-His tag, enterokinase site, *Hind*III, gene sequence of exotoxin A deleted from domain III (PE Δ III), *Hind*III, *Bgl*III, LC3 gene sequence, *Eag*I, KDEL3, stop codon UAA and the *Not*I site at the end of the sequence (Fig. 1).

The sequence PE Δ III-LC3-KDEL3 was codon-optimized and synthesized by GenScript Inc. (USA), and afterwards cloned into the vector pUC57 to afford pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3. The fragment PE Δ III-LC3-KDEL3 was released by double-digestion with the enzymes *Eco*RI/*Not*I and inserted into the pPIC9 plasmid at the same sites to generate the plasmid pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. The resulting construct was transformed into TOP10 or DH5 α cells and plated on lysogenic broth medium supplemented with

100 mg ampicillin l⁻¹. Positive clones were characterized by PCR and enzymatic digestion with *Pst*I/*Hind*III. Oligonucleotide primers used to amplify PEΔIII-LC3-KDEL3 were Fw-PEΔIII 5'-AGATG-TAACCTTGATGAC-3' or Fw-LC3 5'-ACGACATC TGTGCCGAATG-3' and Rv-LC3 5'-GTTGACAGT CGAAGTTTG' or Rv-KDEL3 5'-CTCGAGTTACA GCTCGTCCTTTTACTC-3'. PCR conditions were: denaturation at 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1.5 min and 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The plasmid pPIC9-PEΔIII-LC3-KDEL3 was purified with the PureYield Plasmid Midiprep System Kit (Promega) and the nucleotide sequences of the gene plasmids were confirmed by sequencing (Applied Biosystems AB3730: National Laboratory of Genomics for Biodiversity).

P. pastoris transformation and selection of transformed clones

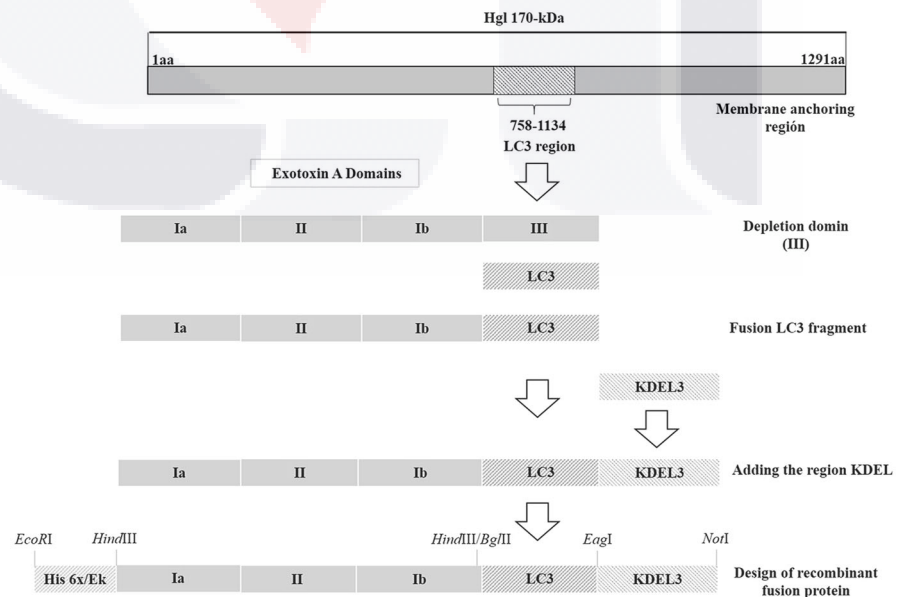
The expression vector pPIC9-PEΔIII-LC3-KDEL3 was linearized with *Nsi*I. Linearized-plasmid concentrations were determined and 3–6 μg linearized plasmid DNA were electroporated at 400 Ω, 25 μF and 1.5 kV into electrocompetent *P. pastoris* cells. Afterwards, 1 ml YPD medium was added to the cells and they were incubated at 30 °C for 1 h. Cells were plated in a selective solid MD medium. The transformed

clones were identified by PCR. Primers Fw-AOX1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' and Rv-AOX1 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' were utilized to test the integration of the transgene. PCR conditions were established as follows: denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 3 min, and a final extension of 72 °C for 5 min.

Expression and purification of recombinant PEΔIII-LC3-KDEL3

The PEΔIII-LC3-KDEL3-positive *P. pastoris* clones were inoculated into 50 ml YPD medium at 28 °C and cultivated overnight. Subsequently, the clones were inoculated in 10 ml BMGY and left to grow at 29 °C. The cells were then collected by centrifugation for 5 min at 3220×g and the supernatant was discarded. They were washed with sterile distilled water and again collected by centrifugation. The secretion of recombinant proteins was induced (1% methanol) in 50 ml BMMY at 29 °C during 24 h. The supernatant was collected by centrifugation of the cell culture for 15 min at 3220×g, concentrated using an ultrafiltration cell with a 20,000 Da cut-off membrane and stored at 4°C. The proteins were then precipitated with trichloroacetic acid or acetone, and resuspended in 25 μl of 1 M Tris-base and 25 μl SDS-PAGE reducing loading buffer. The proteins were purified with the

Fig. 1 Design of the fused recombinant protein PEΔIII-LC3-KDEL3



Capturem His-Tagged Purification Miniprep Kit (Clontech Laboratories) according to the manufacturer's instructions.

Dot blotting

Each nitrocellulose strip was impregnated with 30 µg of protein and blocked at room temperature for 1 h. Subsequently, the strips were incubated with a primary antibody: either rabbit anti-*E. histolytica* polyclonal antibody (1:1000; Ventura-Juárez et al. 2002) or rabbit anti-6X His tag antibody-HRP diluted 1:5000 (Abcam). As a secondary anti-*E. histolytica* polyclonal antibody, anti-rabbit IgG peroxidase (HRP) was employed after dilution 1:1000 (Sigma-Aldrich) and incubation at room temperature for 2 h.

SDS-PAGE and western blot assays

Protein concentrations were determined with the Bradford method. The secreted proteins were separated on 12% polyacrylamide gel at constant voltage (100 V) and then silver stained using the ProteoSilver Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich). Protein glycosylation was evaluated with the Pierce Glycoprotein Staining Kit (ThermoFisher Scientific). Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane Sequi-Blot™ PVDF 0.2 µm (Bio-Rad). After transfer, the membrane was washed with TBS 1X-Tween 0.5 g l⁻¹ buffer and blocked overnight. The recombinant fusion proteins were visualized by immunostaining. The primary antibodies were rabbit anti-*E. histolytica* and rabbit anti-6X His tag antibody-HRP (1:5000). The secondary antibody for anti-*E. histolytica* was anti-rabbit IgG peroxidase, which was incubated at room temperature for 2 h.

Immunization with recombinant proteins

Male hamsters (*Mesocricetus auratus*), 80–100 g, were obtained from the Laboratory Animal Service of the Autonomous University of Aguascalientes. The animals were maintained on a light/dark cycle (12:12) and given Purina Rodent Chow (Ralston Purina Company) and tap water ad libitum. All experiments were performed in accordance with the norms of the Institutional Bioethical Committee and the official Mexican norm NOM-062-Z00-1999 for the handling and care of experimental animals. Hamsters were

divided into four groups (n = 5): the vehicle group was subcutaneously administered PBS 100 µl, while the three immunization groups were subcutaneously immunized with recombinant PEΔIII-LC3-KDEL3 at doses of 30, 50 or 100 µg/animal. Recombinant PEΔIII-LC3-KDEL3 and the vehicle were given on days 1, 7 and 14. Serum was collected prior to the first immunization (pre-immune sera) and 7 days posterior to the last immunization (immune sera) (Fig. 2). The presence of serum antibodies against recombinant PEΔIII-LC3-KDEL3 was observed by direct ELISA.

Detection of specific PEΔIII-LC3-KDEL3 antibodies by ELISA

To identify specific antibodies produced in immunized animals, the ELISA method was carried out as previously described (Vaz et al. 2015), with some modifications. Flat-bottom 96-well plates were coated with 100 µl of 4 mg of PEΔIII-LC3-KDEL3 ml⁻¹, or 100 µl of 80 mg of total amoebic antigen ml⁻¹ (Ventura-Juárez et al. 2002), both prepared in buffer (0.032 M Na₂CO₃/0.068 M NaHCO₃, pH 9.6). Plates were incubated overnight at 4 °C. Subsequently, they were washed three times with PBS 1X-Tween 0.025% buffer. Each well in the plate was blocked with PBS 1X-Tween 0.025% buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37 °C. After three washes, either pre-immune or immune sera (diluted 1:5000) were added to each coated well. Plates were incubated overnight at 4 °C. Excessive material was removed three times with PBS 1X-Tween 0.025% buffer. Recombinant biotinylated-protein G (Pierce) diluted at 1:2000 was then added to each well and left for 1 h. Unbound material was washed away three times. For development of the reaction, avidin-horseradish peroxidase conjugated (ThermoFisher Scientific) was

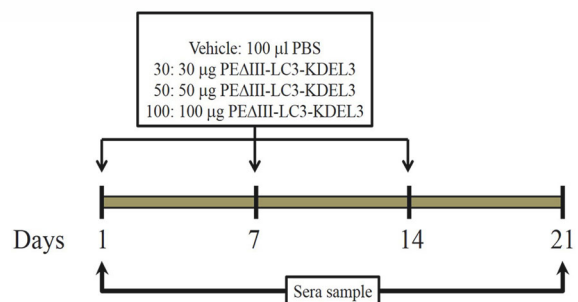


Fig. 2 Experimental protocol for hamster immunization

diluted 1:2000 and incubated at room temperature for 1 h. The OD₄₉₀ was read on a microplate-reader. Assays were conducted in triplicate and OD490 values were averaged.

Statistical analysis

Data analysis was performed with the GraphPad Prism V5 software. Data are expressed as the mean \pm standard error (SEM) of five animals per group and of the triplicate assays. Significant differences between groups were evaluated using one-way ANOVA followed by Turkey's test. Differences were considered statistically significant with $P < 0.05$.

Results and discussion

Construction of PE Δ III-LC3-KDEL3

The purpose of the present study was to design, construct and produce a recombinant protein and test it in a hamster model as a potential vaccine against *E. histolytica*. The development of effective vaccines against amoebiasis requires the use of new antigens and methodologies capable of efficiently generating immunogenic amoebic proteins that can stimulate a protective immune response. Accordingly, the LC3 fragment from the 170 kDa heavy subunit of the *E. histolytica* Gal/GalNAc lectin was herein fused to

PE Δ III (PE domains I and II without domain III) from *P. aeruginosa* and the KDEL3 sequence from *P. pastoris* (Fig. 1).

Expression and detection of recombinant PE Δ III-LC3-KDEL3

The gene sequence for the pUC57-PE Δ III-LC3-KDEL3 with codon optimization of the PE Δ III-LC3-KDEL3 ORF has been submitted to GenBank and assigned accession number KY657281. The PE Δ III-LC3-KDEL3 fragment was subcloned into the expression vector pPIC9. PCR and restriction analysis confirmed the presence of the PE Δ III-LC3-KDEL3 gene in the inducible expression vector (Fig. 3a–c). The integration of the vector into the yeast genome was evaluated by PCR, and the recombinant clones were selected utilizing AOX1 forward and reverse primers. The PCR results confirmed the presence of positive clones by evidencing a 2848 bp product (Fig. 4).

Methanol-induction yielded 3.8 mg PE Δ III-LC3-KDEL3 protein l⁻¹ in 50 ml of BMMY medium. His-tag column purification was conducted with the recombinant proteins from the culture supernatants, leading to a recovery percentage of 44%. Using a dot blot assay, we examined the induction of the recombinant protein PE Δ III-LC3-KDEL3 to confirm the specificity of the anti-6X His tag antibody in the supernatant from a 24 h incubation in *Pichia* culture.

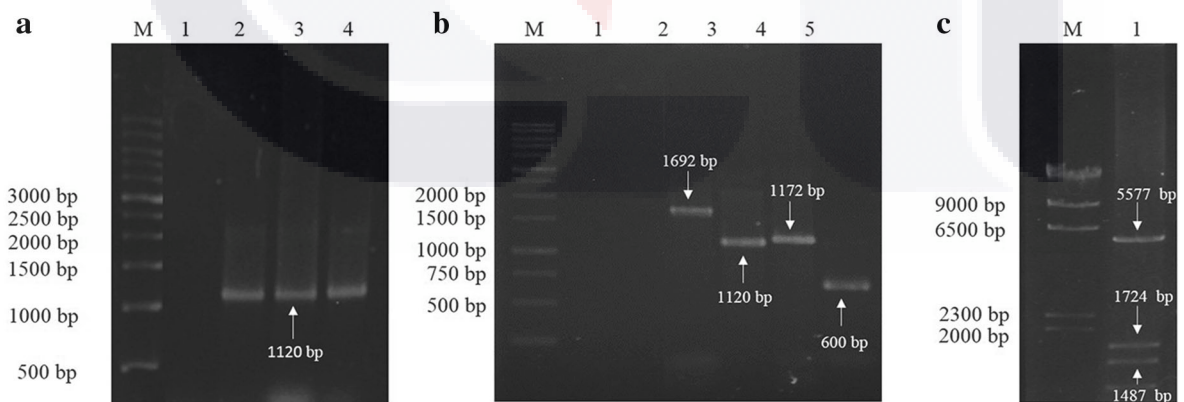


Fig. 3 Cloning and characterization of the construction of pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. **a** PCR product obtained from three different clones (lines 2, 3, 4) of pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 with the primers Fw-PE Δ III and Rv-LC3 (line 1 is empty). **b** Confirmation of each segment of pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3. M is a 1 kb DNA ladder. Lane 1 Negative control. Lane

2 1692 bp with Fw-PE Δ III and Rv-KDEL3 primers. Lane 3 1120 bp with Fw-PE Δ III and Rv-LC3 primers. Lane 4 1172 bp with Fw-LC3 and Rv-KDEL3. Lane 5 600 bp with Fw-LC3 and Rv-LC3. **c** Enzymatic digestion of pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 with *Pst*I/*Hind*III. M is a lambda DNA/*Hind*III ladder. Lane 1 5577, 1724 and 1487 bp fragments obtained

The reactivity of the anti-6X His tag was specific to the recombinant protein in transformed clones (*P. pastoris* GS115:pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3) (Fig. 5a), which is consistent with its reactivity towards anti-*E. histolytica* polyclonal antibodies (Fig. 5b). Recombinant proteins from the harvested supernatants were His-tag purified and then analyzed by SDS-PAGE (Fig. 6a), silver and glycosylation staining (Fig. 6b–c) and immunoblot (Fig. 6d–e). We identified a glycosylated protein, which is common in yeast expression systems. Detected in metal ion affinity-purified fractions, it weighed approximately 67 kDa and was reactive towards the anti-6X His tag antibody. Rabbit Polyclonal antibodies specific for *E. histolytica* also reacted with the 67 kDa protein, consistent with the presence of the LC3 epitope in the product.

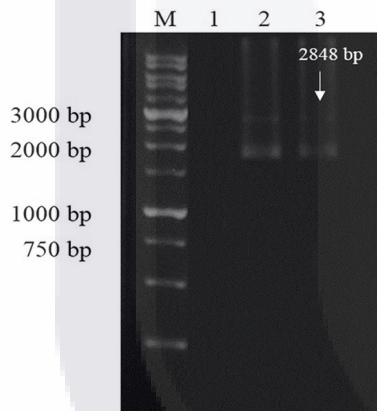


Fig. 4 Analysis of the genomic integration of pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 into *P. pastoris*. The PCR amplicon of 2848 bp was obtained from genomic DNA of transformed clones of *P. pastoris*. M is a 1 kb DNA ladder. Lane 1 Negative control. Lane 2 BGH amplification control (1000 pb). Lanes 3–4 Recombinant clones with the PE Δ III-LC3-KDEL3 gene

The molecular weight of the recombinant protein was lower than the 88 kDa revealed by the *in silico* analysis, and glycosylation did not augment this weight. Frequently, post-translational *O*- and *N*-glycosylation in a *P. pastoris* expression system results in increased molecular mass (Macauley-Patrick et al. 2005). Moreover, the molecular mass of recombinant proteins could be diminished by the absence of other post-translational modifications in yeast, including phosphorylation, sulfation, sialylation, and cryptic protease target sites (Sadhukhan and Sen 1996). Huang et al. (2006) generated a recombinant envelope glycoprotein of classic swine fever virus having lower molecular mass than expected, but with adequate biological properties.

Evaluation of PE Δ III-LC3-KDEL3-specific antibodies

The capacity of PE Δ III-LC3-KDEL3 to stimulate an immune response was tested by measuring total IgG prior and posterior to hamster immunization. The groups administered with the 50 and 100 μ g dose showed a remarkable immune response, with significantly elevated serum IgG levels (2.1- and 2.03-fold higher, respectively) following three immunizations (Fig. 7). In amoebic liver abscess (ALA) patients, the LC3 fragment has elicited a high titer response in serum with anti-LC3 IgG (Soong et al. 1995) and IgA antibodies (Abd-Alla et al. 2004). Additionally, this fragment was shown to prompt dendritic cell maturation and promote the production of two Th1 cytokines, IL-12 and IFN- γ , *in vitro* and *in vivo* (Ivory and Chadee 2007).

Due to the modular structure and corresponding mechanism of action of PE, it is possible to make extensive modifications that can redirect its potent

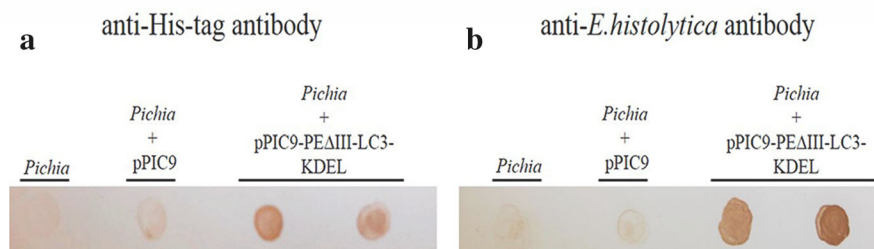


Fig. 5 Identification by a dot blot assay of PE Δ III-LC3-KDEL3 from the supernatant of the *Pichia* culture after 24 h of induction. Recombinant proteins of *Pichia* transformed with

pPIC9-PE Δ III-LC3-KDEL3 were labeled by **a** anti-6X His tag antibody or **b** anti-*E. histolytica* antibody. *Pichia* and *Pichia* + pPIC9 were used as negative controls

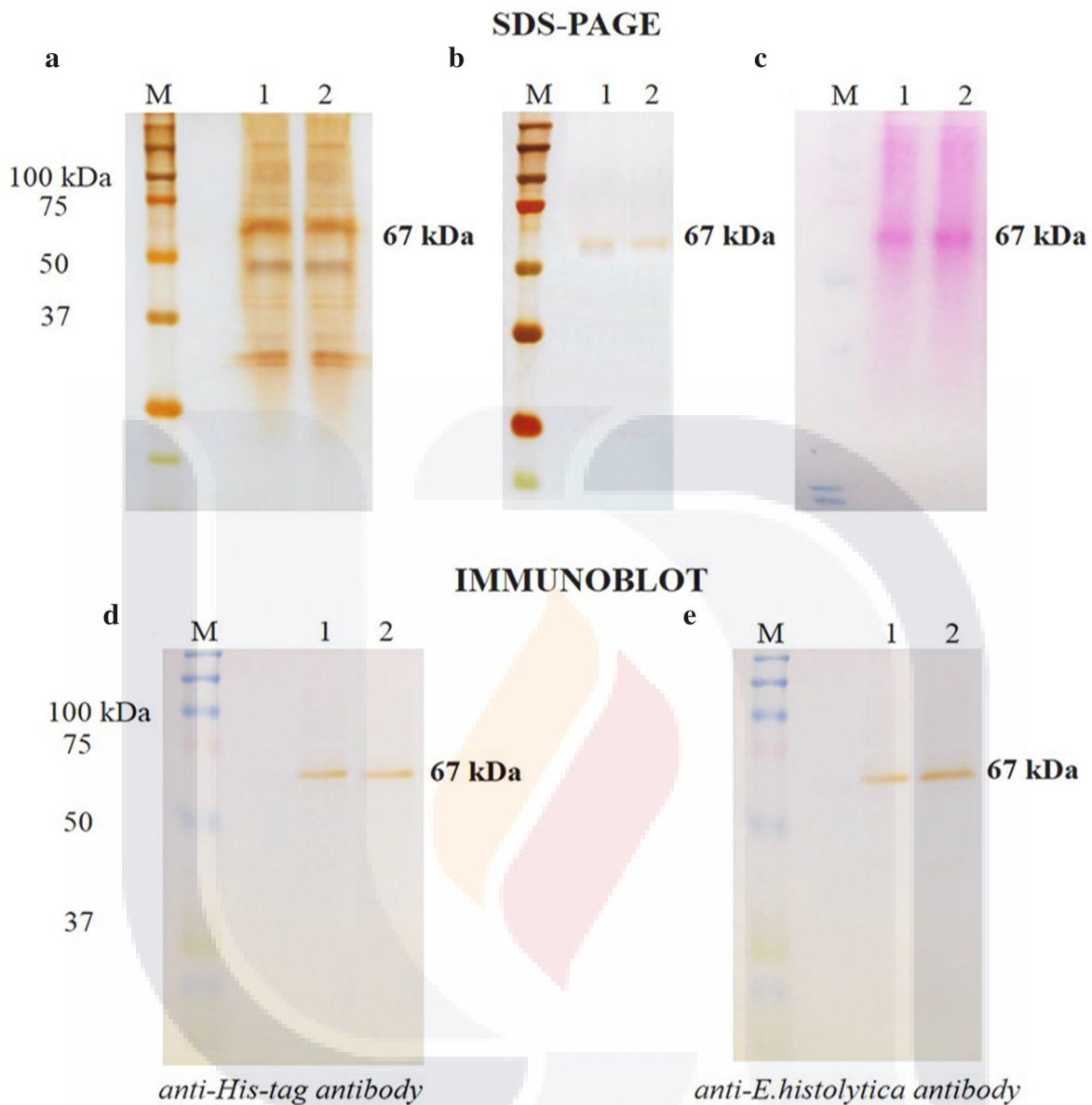


Fig. 6 Recombinant protein analysis by electrophoresis and immunoblot. The *left lane (M)* in each pattern contains the same molecular markers. *Lanes 1 and 2* represent two different *Pichia* transformed clones. The recombinant protein was detected **a** in

cytotoxicity to a desirable function. In combination with a variety of artificial targeting elements, such as receptor ligands and antibody fragments, PE becomes a selective agent for enhancing antigen presentation and inducing specific responses (Weldon and Pastan 2011). Domain II of PE, for example, has been employed to engineer a chimeric multidomain protein for delivering antigen proteins into the cytosol. In this

the supernatant and **b** after His-tag purification. **c** Glycosylation of proteins. **d–e** western blot analysis with the rabbit anti-6X His tag antibody-HRP and rabbit anti-*E. histolytica* antibody demonstrated the heterologous expression of a 67 kDa protein

manner, it acts as an efficient vaccine (Fominaya and Wels 1996) and improves the MHC class I and II presentation of exogenous antigens (Liao et al. 2005).

Soluble endoplasmic reticulum (ER) proteins, including chaperones and components of the quality control machinery, contain a C-terminal KDEL sequence responsible for their recognition and retrieval to post-ER compartments (Capitani and Salles

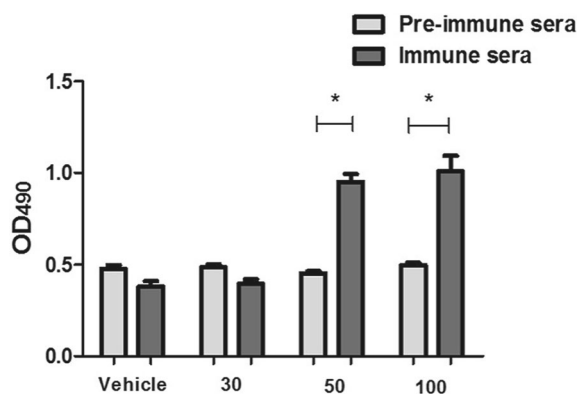


Fig. 7 PE Δ III-LC3-KDEL3 induces IgG antibody production. Male hamsters were immunized subcutaneously with this protein (without adjuvant) on days 1, 7 and 14 (at 30, 50 or 100 μ g/animal). Serum samples were collected on day 7 post-immunization and tested by ELISA. Subcutaneous administration of 50 and 100 μ g of recombinant PE Δ III-LC3-KDEL3 elicited increased levels of IgG-specific antibodies. Bars represent the mean of triplicate assays \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (* $P < 0.01$)

2009). KDEL is a short C-terminal signal that plays a crucial role in locating many proteins in the ER of eukaryotic cells. These are soluble proteins contained in the cisternal lumen and type I transmembrane proteins (Sallese et al. 2009).

The use of molecular strategies, such as the fusion of immunogenic proteins or delivery domains from exotoxins, significantly potentiate the immune response, representing a novel strategy for improving the efficacy of anti-amoebic vaccines.

Conclusion

A recombinant protein, prepared with the LC3 fragment of *E. histolytica* fused to PE Δ III of *P. aeruginosa* and KDEL3 of *P. pastoris*, was evaluated for its specific antibody immune response in an animal model. It elicited an LC3-specific immune response and therefore may be applied as an immunogen for vaccination against *E. histolytica*. A process has herein been described to furnish a sufficient amount of this recombinant protein.

Acknowledgements The present study was financed by grant PIBB11-3 from the Autonomous University of Aguascalientes and Grants 134487 and 241312 from the National Council for Science and Technology of Mexico (CONACYT). Sandra Luz Martínez-Hernández gratefully acknowledges the financial

fellowship granted by CONACYT (244835) as part of the doctorate program in Biological Sciences in the Autonomous University of Aguascalientes.

References

- Abd-Alla MD, Jackson TF, Soong GC, Mazanec M, Ravdin JI (2004) Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infect Immun* 72:3974–3980
- Bagdasarian MM, Nagai M, Frey J, Bagdasarian M (1999) Immunogenicity of Actinobacillus ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine* 17:441–447
- Bruckner DA (1992) Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 5:356–369
- Capitani M, Sallese M (2009) The KDEL receptor: New functions for an old protein. *FEBS Lett* 583:3863–3871
- Fominaya J, Wels W (1996) Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 271:10560–10568
- Goletz TJ, Klimpel KR, Leppla SH, Keith JM, Berzofsky JA (1997) Delivery of antigens to the MHC class I pathway using bacterial toxins. *Hum Immunol* 54:129–136
- Huang C, Chien MS, Hu CM, Chen CW, Hsieh PC (2006) Secreted expression of the classical swine fever virus glycoprotein Erns in yeast and application to a sandwich blocking ELISA. *J Virol Meth* 132:40–47
- Ivory CP, Chadee K (2007) Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 37:385–394
- Liao CW, Chen CA, Lee CN, Su YN, Chang MC, Syu MH, Hsieh CY, Cheng WF (2005) Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic response and antitumor effects. *Cancer Res* 65:9089–9098
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249–270
- Nosedá DG, Blasco M, Recupero M, Galvagno MA (2014) Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOX1 promoter. *Protein Expr Purif* 104:85–91
- 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
- Sadhukhan R, Sen I (1996) Different glycosylation requirements for the synthesis of enzymatically active angiotensin-converting enzyme in mammalian cells and yeast. *J Biol Chem* 271:6429–6434
- Sallese M, Giannotta M, Luini A (2009) Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin Cell Dev Biol* 20:801–809
- Soong CJ, Kain KC, Abd-Alla M, Jackson TF, Ravdin JI (1995) A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin is efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess. *J Infect Dis* 171:645–651

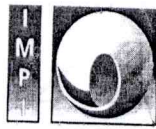
Vaz PK, Hartley CA, Browning GF, Devlin JM (2015) Marsupial and monotreme serum immunoglobulin binding by proteins A, G and L and anti-kangaroo antibody. *J Immunol Methods* 427:94–99

Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V (2002) Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster

liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 48:123–131

Weldon JE, Pastan I (2011) A guide to taming a toxin-recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS J* 278:4683–4700

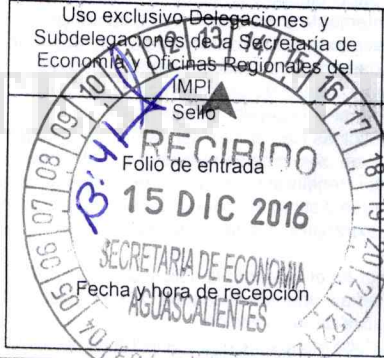




INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisinal de Patentes

OFICINA REGIONAL DEL BAJIO

Solicitud Expediente: **MX/a/2016/017173**
Fecha: 15/DIC/2016 Hora: 13:41:00
Folio: **MX/E/2016/092885** 918576



Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
2) Nacionalidad (es): MEXICANA
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: AVENIDA UNIVERSIDAD NO. 940; COLONIA CIUDAD UNIVERSITARIA C.P. 20131
Población, Estado y País: AGUASCALIENTES, AGUASCALIENTES, MÉXICO
4) Teléfono (clave): (449) 139 32 50 5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): JAVIER VENTURA JUÁREZ, ROBERTO MONTES DE OCA DE LUNA, SANDRA LUZ MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, DANIEL CERVANTES GARCÍA, MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA
7) Nacionalidad (es): MEXICANA
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: AVENIDA UNIVERSIDAD NO. 940; COLONIA CIUDAD UNIVERSITARIA C.P. 20131
Población, Estado y País: AGUASCALIENTES, AGUASCALIENTES, MÉXICO
9) Teléfono (clave): (449) 139 32 50 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)

11) Nombre (s): JESÚS ARTURO FEMAT DÍAZ
12) R G P : RGP-DDAJ-25174
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: AVENIDA UNIVERSIDAD NO. 940; COLONIA CIUDAD UNIVERSITARIA C.P. 20131
Población, Estado y País: AGUASCALIENTES, AGUASCALIENTES, MÉXICO 14) Teléfono (clave): (449) 139 32 50 15) Fax (clave):
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA: martinenol@hotmail.com
LUIS ANTONIO MARTÍNEZ DE ANDA: luanmar@correo.uaa.mx

17) Denominación o Título de la Invención:
"PROTEÍNAS RECOMBINANTES FUSIONADAS DE *Entamoeba histolytica* (LECAg y CISTEIN-PROTEASA) COMO ANTÍGENOS PARA LA PREPARACIÓN DE VACUNAS Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS SEROLÓGICAS"

18) Fecha de divulgación previa
Día Mes Año
19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisinal de la solicitud
Número
21) Fecha de presentación
Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:
País Fecha de presentación
Día Mes Año No. de serie

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
	Comprobante de pago de la tarifa		Documento de cesión de derechos
	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
			TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.
Nombre y firma del solicitante o su apoderado: Jesús Arturo Femat Díaz
Lugar y fecha: Aguascalientes, Ags. 15 de Diciembre de 2016

Consideraciones generales para su llenado:

- Este formato es de distribución gratuita. Se autoriza su libre reproducción, siempre y cuando éste no sea alterado y sea presentado impreso su anverso (Página 1) y reverso (Página 2) en una sola hoja de papel blanco y en tamaño oficio.
- Debe llenarse en idioma español, preferentemente a máquina. No obstante, podrá presentarse con letra de molde, siempre que la solicitud sea legible. La información de la solicitud debe ser requisitada toda por el mismo medio, sin tachaduras ni enmendaduras.
- El formato de solicitud por duplicado, debidamente requisitado y firmado en todos sus ejemplares, así como sus documentos anexos, deben presentarse en la Coordinación Departamental de Recepción y Control de Documentos de la Dirección Divisional de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, con domicilio en Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Delegación Xochimilco, C.P. 16020, México, D.F., con horario de atención de 8:45 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Oficinas Regionales del IMPI o las Delegaciones o Subdelegaciones Federales de la Secretaría de Economía.
- También podrá remitirse la solicitud por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes o, en su caso, presentarse por transmisión telefónica facsimilar, en los términos previstos en el artículo 5o. del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Los documentos anexos redactados en idioma distinto al español deberán acompañarse de la traducción correspondiente.
- Los documentos anexos provenientes del extranjero, cuando proceda, deberán acompañarse de la legalización o, en su caso, apostilla correspondiente.
- En el formato de solicitud marque con una X en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
 - País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
 - En el listado de documentos que se anexan mencione el total de hojas que comprende cada documento y al final el total de hojas

Trámite al que corresponde la forma: Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad.
Número de Registro Federal de Trámites y Servicios: IMPI-03-001, IMPI-03-002, IMPI-03-003.
Fecha de autorización de la forma por parte de la Dirección General Adjunta de Propiedad Industrial del IMPI: 2-XII-2011.
Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria: 8-XII-2011.

Fundamento jurídico-administrativo:

Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 38-47, 50, 52, 53-54, 55, -61 (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 2-VIII-94, 25-X-96, 26-XII-97, 17-V-99, 26-I-04, 16-VI-05, 25-I-06, 06-V-09, 06-I-10, 18-VI-10 y 28-VI-10).
Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 5-8, 16, 24-39, 43, 45 y 46 (D.O.F. 23-XI-94, reformas D.O.F. 10-IX-02, 19-IX-03 y 10-VI-11).
Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 3-10 y 34 (D.O.F. 14-XII-94, reformas D.O.F. 22-III-99, 14-XII-00, 20-VI-03, 11-VII-03, 18-III-10 y 2-IV-10).
Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 1 inciso a); 9, inciso a) y demás aplicables ((D.O.F. 23-VIII-95, reformas D.O.F. 28-XII-95, 10-XII-96, 2-V-97, 4-V-98, 23-II-99, 11-X-00, 17-X-01, 13-XI-01, 24-XII-01, 27-II-02, 14-III-02, 14-XI-02, 04-II-03, 8-X-03, 27-X-04, 23-III-05, 13-IX-07, 1-VI-09, 10-VIII-09, 24-VIII-09, 1-X-10 y 10-V-11).
Acuerdo por el que se da a conocer la lista de instituciones reconocidas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para el depósito de material genético (D.O.F. 30-V-97).
Acuerdo por el que se establecen reglas y criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art. 4-18 (D.O.F. 9-VIII-04).
Acuerdo por el que se dan a conocer los horarios de trabajo del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art.1. (D.O.F. 31-III-99, reforma D.O.F. 20-I-11).

Documentos anexos:

Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (duplicado)

Solicitud de Registro de Diseño Industrial

- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (duplicado)

Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:

- Constancia de depósito de material biológico
- Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
- Acreditación del poderdante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
- Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
- Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia)
- Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
- Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

Criterios de resolución del trámite

- Presentar toda la documentación requerida y pagos de la tarifa conforme a la legislación nacional y convenios internacionales de los que México forma parte.
- Será suficiente el cumplir con los requisitos formales al momento de presentar su solicitud.

Tiempo de respuesta:

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses. No aplica la positiva ni la negativa ficta.

Número telefónico para quejas:

Órgano interno de Control en el IMPI
5624-04-12 o 13 (directo)
5624-04-00 (conmutador)
Extensiones: 11028 y 11234
Fax: 56-24-04-35
Correo electrónico: quejanet@impi.gob.mx

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL a los teléfonos: 20002000 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01-800-11205-84 o desde Estados Unidos y Canadá al 1-800-475-23-93.

Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 53 34 07 00 extensiones 10098 y 10026.