

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR
NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS CON PÉPTIDOS
DERIVADOS DE LA LECTINA DE 220 kDa DE *Entamoeba histolytica***

POR:

Q.B.P. ALEJANDRO VELARDE CALDERÓN

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

FEBRERO DE 2022



Chihuahua, Chih., a 15 de febrero de 2022.

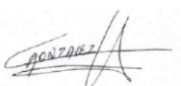
Oficio: 07/CA/SIP/22

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Evaluación de la respuesta inmune inducida por nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos derivados de la lectina de 220 kDa de *Entamoeba histolytica*”**, presentada por el Q.B.P. **Alejandro Velarde Calderón**, alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

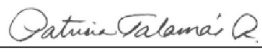
Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

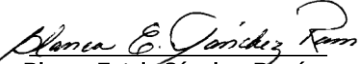
A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”


Dra. María del Carmen González Horta
Asesora de tesis

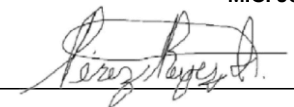

Dra. María del Rocío Infante Ramírez
Asesora de tesis


M.C. Tania Samanta Siqueiros Cendón
Asesora de tesis


Dra. Patricia Talamás Rohana
Asesora de tesis


Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez
Directora de tesis


M.C. José Jesús Guzmán Mendoza
Co-Director de tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado

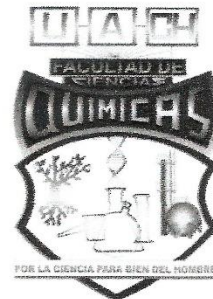


*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA



24 de enero del 2022

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas, UACH.
P r e s e n t e

Los abajo firmantes Directora y Co-director de la tesis intitulada "**Evaluación de la respuesta inmune inducida por nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos derivados de la lectina de 220 kDa de *Entamoeba histolytica***", realizada por el estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología **QBP Alejandro Velarde Calderón**, nos permitimos hacer de su conocimiento que después de revisar y hacer las indicaciones correspondientes al tesista sobre las correcciones que era necesario efectuar y habiéndolas realizado, extendemos la presente:

LIBERACIÓN DE TESIS

Manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos una copia, ha cumplido con los objetivos señalados por lo que se considera que se puede proceder a los trámites para su revisión por el Comité de Tesis para la obtención del grado.

ATENTAMENTE

Directora de Tesis


Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez

Co-Director de tesis


M. en C. José Jesús Guzmán
Mendoza

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología III de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Chihuahua.

El autor del trabajo recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT; No de registro 1028285)

“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”.

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACyT por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Chihuahua y a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme un lugar dentro de sus aulas y laboratorios.

También, agradezco a la Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez por aceptarme en su laboratorio como parte de su equipo de investigación. Muchas gracias Dra. por la confianza, compañía y tantos conocimientos compartidos. Por escuchar cada una de mis dudas y ayudarme con dedicación y paciencia. Por alentar cada idea y dirigirme en todo momento.

A mi co-director y amigo incondicional, M.C. Jesús Guzmán. Muchas gracias por acompañarme en esta aventura en camino de la ciencia. Eres un gran compañero y amigo. Gracias por compartir tus conocimientos y permitir formarme con tus enseñanzas.

Agradezco también a mis asesoras, la Dra. María del Carmen González Horta, la Dra. Patricia Talamás Rohana, la Dra. María del Rocío Infante Ramírez, la M.C. Tania Siqueiros Cendón, por ser parte de mi comité evaluador y por cada una de sus valiosas aportaciones a este trabajo y por la atención que brindaron en todo momento.

Al grupo de trabajo en general, y con mucho cariño a mis amigos y compañeros de laboratorio Omar, Lory, Zaira, Jessi, Zule, Alex, Alejandra, Juli, Leo. A todos ustedes, gracias por ayudarme durante el aprendizaje de técnicas y procedimientos y escucharme en todo momento. También, les quiero agradecer por brindarme su amistad, sé que nuestra amistad perdurará por un largo tiempo. Los quiero mucho.

Quiero dar un agradecimiento especial al equipo de trabajo liderado por la Dra. Patricia Talamás Rohana de la Unidad de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV. Por compartir sus conocimientos durante mi estancia, sin su ayuda este proyecto no pudiera haber sido culminado. Gracias a la Dra. Talamás, a los técnicos el M.C. Carlos, la Dra. Ivonne y Daniel. También a los compañeros Elena, Irving, Dayana y Paulina. Su ayuda fue indispensable para el proyecto, gracias por compartir su tiempo, conocimientos y también por brindarme su amistad.

Muchas gracias al equipo del Dr. Pavel Espino y al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo Sede Chihuahua. En especial a Mayela y Blanca. Sus conocimientos en citometría de flujo fueron una parte importantísima en este proyecto. Cuentan con un compañero y amigo para lo que se ofrezca.

También quiero agradecer a todos los amigos que me brindaron apoyo durante estos dos años, Aby, Daniela, Arlett, Beto, Roy, Kevin, Mareli. Ustedes por acompañarme siempre, escuchar mis alegrías y tristezas, ustedes son impulso en mi vida.

Y doy un agradecimiento muy especial a mi familia, mi mamá Elizabeth, mi papá Luis Carlos, mis hermanos Luis y Carlos y a mis sobrinos queridos, Carlos Adrián y Natalia. Porque han apoyado cada una de mis decisiones. Porque me escuchan siempre, por creer en mí aún más de lo que yo mismo he podido. No lo digo muy seguido, pero los quiero mucho, porque están conmigo en todo momento. Yo soy el reflejo de mi familia y me siento muy orgulloso de ello. Gracias por este logro que por supuesto es de ustedes. Los amo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
II.	ANTECEDENTES.....	7
2.1	Amibiasis.....	7
2.2	Respuesta inmune contra <i>E. histolytica</i>	11
2.3	Respuesta inmune celular contra <i>E. histolytica</i>	12
2.4	Propuestas de vacunas.....	17
2.5	Nanotubos de carbono.	20
2.6	Vacunas a partir de CNTs	22
	JUSTIFICACIÓN	27
III.	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo general	28
3.2	Objetivos particulares.....	28
	HIPÓTESIS	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1	Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>	30
4.2	Determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratón y hámster mediante citometría de flujo.	30

4.3 Protocolo de inmunización en hámster	33
4.4 Determinación del grado de protección <i>in vivo</i> en hámsteres inmunizados con PL220-CNTs y retados con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34
4.5 Determinación de anticuerpos en suero de hámster por inmunoblot	35
4.6 Cultivo primario de esplenocitos de hámster.	36
4.7 Ensayos de proliferación	37
4.8 Método estadístico	38
V. RESULTADOS	39
5.6 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones estimulados con los diversos antígenos.....	39
5.1 Análisis histopatológico en pulmón de ratones inmunizados con distintos antígenos.	45
5.2 Distribución del espacio alveolar en ratones inmunizados con distintos antígenos.	49
5.7 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámster estimulados con los diversos antígenos.....	51
5.3 Inmunodetección de anticuerpos α -L220 en hámsteres inmunizados con los diferentes antígenos.....	59
5.4 Ensayos de proliferación celular en cultivos primarios de esplenocitos de hámsteres estimulados con los distintos antígenos.	65

5.5 Eficacia de protección contra la formación de absceso hepático amebiano en hámsteres retados con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	70
VI. CONCLUSIONES.....	73
7.1 Homología entre citocinas de <i>Mus musculus</i> y <i>Mesocricetus auratus</i>	75
7.2 Estandarización de la cuantificación de citocinas mediante citometría de flujo.	76
7.3 Obtención de anticuerpos policlonales α -L220 en hámster (pAb).....	76
VII. REFERENCIAS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Diluciones de estándares de citocinas.	32
Tabla II. Formulaci3n del ant3geno para cada grupo.	33
Tabla III. Producci3n de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de los diferentes grupos con diferentes est3mulos.....	42
Tabla IV. Identificaci3n de respuesta Th1, Th2 y Th17 a trav3s del radio de IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /IL-6 en sobrenadantes a las 48 h.	44
Tabla V. An3lisis histopatol3gico de ratones BALB/c inmunizado con distintos ant3genos.....	46
Tabla VI. Concentraci3n de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivos estimulados con diversos ant3genos a las 24 horas.	54
Tabla VII. Identificaci3n de respuesta Th1, Th2 y Th17 a trav3s del radio de IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /IL-17A en sobrenadantes a las 24 h.	55
Tabla VIII. Concentraci3n de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivos estimulados con diversos ant3genos a las 48 horas.	57
Tabla IX. T3tulos de anticuerpos α -L220 obtenidos en los diferentes grupos.	64
Tabla X. T3tulos de anticuerpos α -L220 obtenidos en los diferentes grupos retados con trofozo3itos de <i>E. histolytica</i>	64
Tabla XI. Desarrollo de AHA en h3msteres inmunizados y no inmunizados despu3s del reto intrahep3tico con <i>E. histolytica</i>	72
Tabla XII. Porcentaje de identidad entre citocinas de <i>Mus musculus</i> y <i>Mesocricetus auratus</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de infección por <i>E. histolytica</i>	8
Figura 2. Factores de virulencia que <i>E. histolytica</i> utiliza para adherirse y degradar la mucosa del hospedero.	10
Figura 3. Respuesta inmune inducida contra <i>E. histolytica</i>	16
Figura 4. Funcionalización de CNTs a través de diversos métodos químicos.....	21
Figura 5. Mecanismos de captación celular de CNTs.	23
Figura 6. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 48 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratón BALB/c inmunizado.	41
Figura 7. Análisis histopatológico en pulmón de ratón inmunizados con distintos antígenos.....	47
Figura 8. Hallazgo histopatológico en pulmón derecho de ratón inmunizado con P-CNTs.	48
Figura 9. Distribución de espacio alveolar de pulmón de ratón inmunizados con diferentes antígenos.....	50
Figura 10. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 24 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámsteres inmunizados con A, PBS; B, L220 y C, PL220-CNTs.	53
Figura 11. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 48 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámsteres inmunizados con A, PBS; B, L220 y C, PL220-CNTs.	56
Figura 12. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 en los sueros de los hámsteres de los diferentes grupos.	58

Figura 13. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámster control inmunizados con PBS 1X..	60
Figura 14. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con PBS 1X y retado con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	60
Figura 15. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámster inmunizados con la L220.....	61
Figura 16. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inoculados con la L220 y retado con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	62
Figura 17. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con <i>PL220</i> -CNTs.....	63
Figura 18. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con <i>PL220</i> -CNTs y retado con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	63
Figura 19. Proliferación celular de esplenocitos de hámster inmunizados y estimulados con los diferentes antígenos en cultivo.	67
Figura 20. Aspecto de la proliferación celular en esplenocitos de hámster inmunizado con <i>PL220</i> -CNTs y expuestos a los diferentes antígenos a las 24 h de cultivo.....	68
Figura 21. Aspecto de la proliferación celular en esplenocitos de hámster inmunizado con <i>PL220</i> -CNTs y expuestos a los diferentes antígenos a las 48 h de cultivo.	69
Figura 22. Formación de AHA en hámsteres inmunizados y retado por vía intrahepática con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	71
Figura 23. Inmunodetección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en sueros de hámsteres inmunizados.....	77

Figura 24. Curvas estándar de citocinas Th1/Th2/Th17.....	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
AHA	Absceso hepático amebiano
ALT	Transaminasa glutámico pirúvica
AST	Transaminasa glutámica oxalacético
CC	Quimiocina CC
CD	Célula dendrítica
CD40	Clúster de diferenciación 40
CD80	Clúster de diferenciación 80
CD86	Clúster de diferenciación 86
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CFA	Adyuvante completo de Freund
CNTs	Nanotubos de carbono
ConA	Concanavalina A
CP	Cisteín proteasa
CTL	Control
CXC	Quimiocina CXC
DAB	Diaminobencidina
EhADH112	Adhesina de 112 kDa de <i>E. histolytica</i>
EhCPADH112	Adhesina con cisteín proteasa de 112 kDa de <i>E. histolytica</i>
Fc	Fracción cristizable
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
Gal/GAINAc	Lectina galactosa N-Acetilgalactosamina

AIF	Adyuvante incomplete de Freund
IFN-γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G subclase 1
IgG2	Inmunoglobulina G subclase 2
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
L220	Lectina de 220 kDa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LecA	Lectina A
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
mL	Mililitro
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NET	Trampa extracelular de neutrófilo
NO	Óxido nítrico
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
P-CNTs	Nanotubos de carbono purificados
PE	Ficoeritrina
PER4	Receptor 4 de prostaglandina E
PFA	Paraformaldehído
Pg	Picogramo

PGE₂	Prostaglandina E 2
PIX²	Píxeles cuadrados
PL220-CNTs	Nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos de la L220
PVDF	Polivinildenodifloruro
SD	Desviación estándar
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SREHP	Proteína rica en serina de <i>E. histolytica</i>
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
TA	Temperatura ambiente
Th1	T cooperador de tipo 1
Th2	T cooperador de tipo 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UP-CNTs	Nanotubos de carbono no purificados
μg	Microgramo



RESUMEN

La amibiasis es una infección provocada por el parásito *Entamoeba histolytica*, la cual es un problema de salud pública a nivel mundial y la causa de consulta más frecuente por infecciones intestinales en la población infantil. Para prevenir esta infección se han desarrollado varios prototipos de vacunas con resultados poco favorables. La problemática principal radica en el tipo de respuesta inmune inducida por este parásito. En la búsqueda de una respuesta inmune celular que promueva una respuesta cooperadora de tipo 1 (Th1), se ha trabajado en la funcionalización de nanotubos de carbono con péptidos derivados de la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* (PL220-CNTs) para el desarrollo de una nanovacuna. En el presente trabajo se analizó la respuesta inmune en ratones BALB/c y hámsteres (*Mesocricetus auratus*) inmunizados por vía subcutánea con PL220-CNTs. La respuesta humoral en los animales inmunizados o no con los PL220-CNTs se evaluó en suero mediante Western blot. Los ratones inmunizados con PL220-CNT más adyuvante (PL220-CNT Ady) provocaron una alta respuesta humoral (títulos de anticuerpos 1:1000), por el contrario, los animales (ratones y hámsteres) inmunizados con PL220-CNT sin adyuvante mostraron títulos bajos de anticuerpos (1:50). Por otro lado, la respuesta inmune celular se determinó en suero de los animales y en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos mediante citometría de flujo, se identificó que la citocina secretada en mayor cantidad fue la IL-17A, lo cual indica que la respuesta inmune que se desencadena por la inmunización con los PL220-CNTs es de tipo Th17. Adicionalmente, se utilizó el modelo de absceso hepático amebiano (AHA) en hámster para demostrar la eficacia de la inmunización en la prevención de la formación de AHA. Se determinó la inhibición en el desarrollo del AHA en los animales inmunizados con los PL220-CNTs denotando que los animales producen un tipo de respuesta inmune que les confiere protección contra la infección.



ABSTRACT

Amebiasis is an infection caused by the parasite *Entamoeba histolytica*; it is a global public health problem and the most frequent cause of consultation for intestinal infections in children. Several vaccine prototypes have been developed to avoid this infection with unfavorable results. The main problem lies in the immune response induced by this parasite. In the search for a cellular immune response that promotes a type 1 (Th1) helper, the functionalization of carbon nanotubes with peptides derived from the 220 kDa lectin of *E. histolytica* (PL220-CNTs) was done to develop a nanovaccine. The present work analyzed the immune response in BALB/c mice and hamsters immunized with PL220-CNTs via subcutaneous. The humoral response in animals immunized or not with PL220-CNTs was evaluated in serum by Western blot. Mice vaccinated with PL220-CNT plus adjuvant (PL220-CNT Adj) elicited a high humoral response (antibody titers 1:1000); on the contrary, animals (mice and hamsters) immunized with PL220-CNT without adjuvant showed low titers of antibodies (1:50). On the other hand, the cellular immune response was determined in the serum of the animals and splenocytes culture supernatants by flow cytometry. Results showed that the main cytokine secreted was IL-17A, which indicates that the immune response triggered by immunization with PL220-CNTs is Th17 type. Additionally, to demonstrate the efficacy of vaccination amebic liver abscess (ALA) model in hamsters was used. Results showed that animals immunized with PL220-CNTs did not develop ALA, which suggests that immune response elicited by PL220-CNTs in animals protects them against infection.



I. INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una infección causada por el parásito *Entamoeba histolytica* la cual continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. En México, esta infección es un motivo de consulta frecuente y tan sólo en el Instituto Mexicano del Seguro Social se atienden más de medio millón de casos al año (González-Vázquez *et al.*, 2012). *E. histolytica* es el patógeno intestinal más frecuente después de *Giardia lamblia*, siendo la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios. *E. histolytica* posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal causando colitis amebiana (Gómez *et al.*, 2007). La fisiopatología inicia con la adhesión de la amiba a la pared intestinal con el consecuente daño a la membrana celular, lisis, fagocitosis y digestión de las células ingeridas.

En relación con la respuesta inmune, se ha demostrado que *E. histolytica* provoca una respuesta inmune humoral mediada por la producción de inmunoglobulinas de los isotipos IgA, IgE e IgG circulantes tanto en pacientes con amibiasis intestinal como en pacientes con absceso hepático amebiano (AHA), predominando la IgG en respuesta a la amibiasis sintomática (Trissl, 1982). Estudios realizados por Bernin *et al.*, (2014) demostraron que tanto pacientes con AHA y asintomáticos desarrollaron títulos altos de IgG específicos contra *E. histolytica* y todas las subclases de IgG, así como IgA. Los títulos de IgG1 e IgG2 contra el glucolípido lipofosfoglicano de *E. histolytica* fueron más altos en los pacientes con AHA (Bernin *et al.*, 2014).

Haque *et al.*, en 2001, demostraron que la presencia de anticuerpos IgA específicos de lectina Gal/GalNAc en las heces se correlacionaba con tasas reducidas de reinfección con *E. histolytica* en un estudio en niños susceptibles de Bangladesh. Esta implicación también se confirmó con pacientes que se habían recuperado de AHA. Los aumentos en los anticuerpos IgA anti-lectina Gal/GalNAc en pacientes post AHA se asociaron con la eliminación de infecciones amebianas posteriores, lo



que demuestra que los pacientes post AHA desarrollaron una mayor capacidad de respuesta inmune y mantuvieron la memoria inmunológica (Abd-Alla *et al.*, 2006). Por otro lado, los niveles de IgG tienen efectos protectores o no protectores sobre la susceptibilidad a las infecciones amebianas dependiendo de las principales subclases de IgG inducidas por la infección, es decir, IgG1 e IgG2 inducidas por Th2 y Th1, respectivamente. Sin embargo, se sabe que la efectividad de la respuesta inmune humoral en los pacientes se ve limitada por las cisteína-proteasas liberadas por el parásito que causan la degradación de las inmunoglobulinas y evitan la acción de los anticuerpos generados (Tran *et al.*, 1998).

Por otro lado, varias investigaciones han encontrado que los portadores asintomáticos de *E. histolytica* presentan altos niveles de interferón gamma (IFN- γ), el cual es característico de una respuesta celular mediada por células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), mientras que los pacientes con amibiasis invasiva presentan valores altos de IL-4, característica de una respuesta humoral, mediada por anticuerpos (Sánchez-Guillén *et al.*, 2002). Guo *et al.*, en 2011, probaron que ratones CBA/J inmunizados con un fragmento recombinante de la lectina Gal/GalNAc el "LecA" presentaron una respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Adicionalmente, al realizar cultivos de esplenocitos de estos animales identificaron mediante citometría de flujo en sobrenadantes de cultivos, niveles de IFN- γ e IL-17 relacionados en la actividad amebicida (Guo *et al.*, 2011a).

Con el fin de combatir la amibiasis, numerosas investigaciones se han enfocado a estudiar diferentes proteínas de *E. histolytica* como potenciales antígenos para la fabricación de una vacuna. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, a la fecha no existe una vacuna totalmente eficaz para combatir la amibiasis. Por ello, destaca la importancia de innovar en el desarrollo de nuevas vacunas las cuales permitan generar una respuesta inmune celular eficiente para combatir esta infección. Dentro de estas nuevas alternativas, encontramos la nanomedicina, una ciencia emergente que ha permitido el desarrollo del diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades mediante el uso de nanomateriales (Dai, 2002). Dentro de



los materiales más innovadores en la nanomedicina se encuentran los nanotubos de carbono (CNTs) (Smith *et al.*, 2015). Estos tienen la particularidad de que pueden ser funcionalizados o dopados con diversas moléculas en su superficie y de esta forma cambiar sus propiedades o añadir alguna función biológica, permitiéndoles así su utilización como nanoacarreadores para la fabricación de nanovacunas. Montes-Fonseca *et al.*, en 2012, purificaron CNTs (P-CNTs) y los funcionalizaron con la lectina de 220 kDa de *E. histolytica* (L220), al evaluar su citotoxicidad en una línea celular de macrófagos J774 demostraron que los macrófagos proliferaron en comparación al control sin estímulo, lo cual sugirió baja citotoxicidad de estas nanopartículas en un sistema *in vitro*, misma que fue dependiente de la purificación y la funcionalización (Montes-Fonseca *et al.*, 2012a). Por otro lado, Guzmán-Mendoza *et al.* (2018) demostraron la funcionalización de P-CNTs con péptidos derivados de la L220 (PL220-CNTs) mediante una esterificación enzimática y evaluaron su citotoxicidad en una línea celular de macrófagos, lo cual demostró que estas nanopartículas provocan una activación de los macrófagos con signos de fagocitosis. Esto sugiere un reconocimiento de los PL220-CNTs por los macrófagos, y los postula como candidatos para la creación de una nanovacuna contra la amibiasis. Sin embargo, es necesario avanzar con el estudio de la inmunogenicidad de estas partículas.

Recientemente, se evaluó la respuesta inmune humoral de ratones BALB/c que fueron inmunizados con PL220-CNTs. Los resultados mostraron una baja producción de anticuerpos anti-L220 en el suero de animales inmunizados con los PL220-CNTs comparados con los títulos encontrados en animales inmunizados con la L220. Adicionalmente, al analizar la respuesta de proliferación celular en cultivos de esplenocitos de animales inmunizados con los diversos inmunógenos y estimularlos con los PL220-CNTs, se observó un aumento significativo en la proliferación celular en los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con los PL220-CNTs comparados con la proliferación de las células de los otros grupos. Estos resultados sugieren que en los ratones inmunizados con los PL220-CNTs se generaron células de memoria capaces de reconocer a los péptidos funcionalizados



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

presentes en la L220 *in vitro* (Velarde-Calderón, 2019). Estos resultados sugieren que los PL220-CNTs utilizados en ese proyecto actúan como inmunógenos generando una respuesta inmune de tipo celular, lo cual resulta importante para producir una vacuna funcional contra *E. histolytica*. Sin embargo, el tipo de citocinas secretado por los esplenocitos no fue determinado. Por lo cual, es importante caracterizar el tipo de respuesta inmune generada y demostrar su eficacia para prevenir la infección por este parásito en un modelo susceptible como el hámster.



II. ANTECEDENTES

2.1 Amibiasis

La amibiasis es una infección causada por *Entamoeba histolytica*, parásito protozoo cosmopolita que tiene la capacidad de infectar al humano a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados con materia fecal, donde se encuentran los quistes maduros en fase tetra nucleada. Al llegar al intestino grueso, los quistes comienzan la fase de desenquistamiento permitiendo a los trofozoítos reproducirse mediante división binaria en el moco que recubre el intestino. Algunos trofozoítos alcanzan la barrera epitelial del intestino atravesándola hacia la lámina basal, donde podrán alcanzar torrente sanguíneo y diseminarse hacia otros órganos estableciendo infecciones extra intestinales en hígado, pulmones y cerebro, principalmente (Figura 1) (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; R Haque *et al.*, 2003; Stanley Jr, 2003).

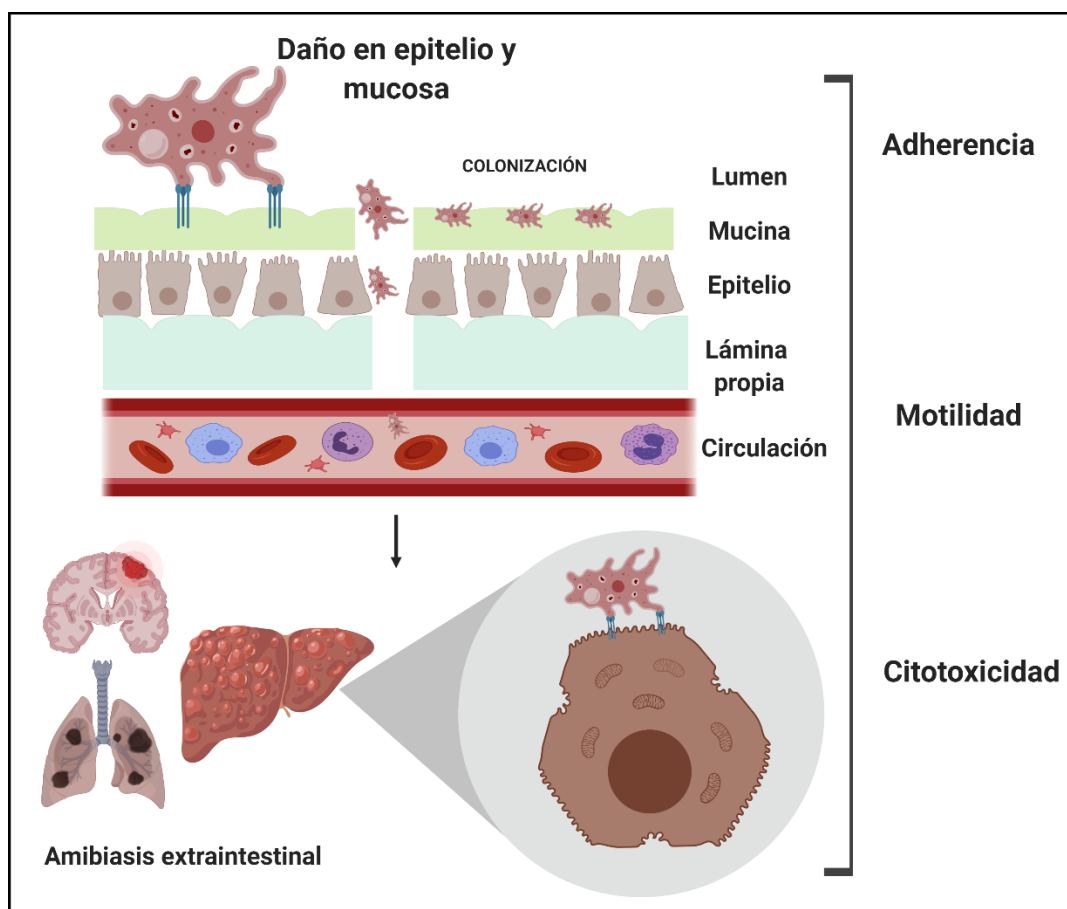


Figura 1. Mecanismo de infección por *E. histolytica*. *E. histolytica* es capaz de adherirse a la mucosa intestinal y comenzar a degradar la mucina, el epitelio y la lámina propia, en este punto el parásito llega a la circulación sanguínea y migra hacia otros órganos, en donde ocasiona una amibiasis extraintestinal con un subsecuente daño en los órganos residentes (Creado en Biorender.com).

Los países mayormente afectados son aquellos que se encuentran en vías de desarrollo, cada año se reportan varios millones de personas infectadas y hasta 1.5 millones de muertes (Haque *et al.*, 2003). Entre los factores de riesgo se incluyen principalmente la cultura de la higiene y el nivel socioeconómico, siendo los países más afectados aquellos en situación bastante precaria y que no tienen los recursos suficientes para dar un correcto tratamiento a las aguas residuales (WHO, 1998).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México (SINAVE) reportó en el año 2018 un total de 203,174 casos de amibiasis intestinal y 175 casos de



absceso hepático amebiano, siendo los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero de los más afectados, cuyo reporte llega a 22 853, 17 511 y 11 387 casos de amibiasis intestinal, respectivamente. Mientras que en el estado de Chihuahua se reportaron 2, 610 casos de amibiasis intestinal (SINAVE, 2018).

Esta capacidad de infección se atribuye a los factores de virulencia que *E. histolytica* posee para formar ameba poros, así como a la actividad citotóxica relacionada con la secreción y expresión de proteínas que le permiten adherirse al epitelio. De esta manera le es posible degradar la matriz extracelular y producir citólisis de las células epiteliales para penetrar dentro de la mucosa. Finalmente, se disemina a través del organismo hacia otros tejidos y órganos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

Diferentes estudios han demostrado que moléculas como la lectina galactosa N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) de *E. histolytica* es un importante factor de virulencia relacionado con la adherencia del trofozoíto a la pared intestinal, ya que permite que los residuos de la lectina se unan a las glucoproteínas de la mucosa intestinal (Dodson *et al.*, 1999). Otros estudios también destacan a la adhesina de 112 kDa (EhADH112), la cual es una glucoproteína con actividad de adhesina involucrada en la eritrofagocitosis (García-Rivera *et al.*, 1999). Aunque esta adhesina fue reportada inicialmente como responsable de la adhesión de eritrocitos, previo al proceso de fagocitosis, actualmente se sabe que esta adhesina posee también actividad de cisteínproteasa y que es capaz de participar en la disrupción del epitelio intestinal por hidrólisis de las claudinas 1 y 2 de la *zonula occludens* (Figura 2) (Cuellar *et al.*, 2017).

Por otro lado, se encuentran dos proteínas altamente inmunogénicas que han sido de interés para la fabricación de una vacuna, estas son la L220 y la proteína rica en serina (SREHP). Trabajos previos han demostrado que estas proteínas tienen actividad de suprimir o activar la proliferación de linfocitos T, esenciales para la respuesta inmune contra este parásito (Figura 2) (Rosales-Encina *et al.*, 1987; Stanley *et al.*, 1990; Talamas-Rohana *et al.*, 1995a).

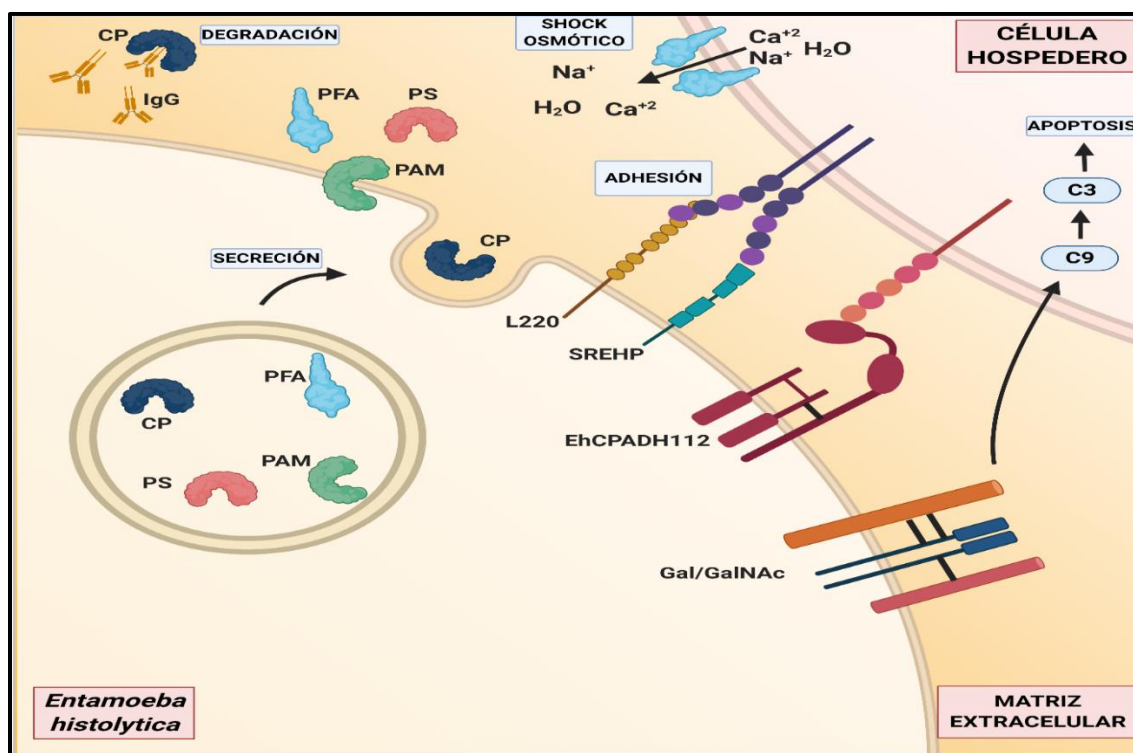


Figura 2. Factores de virulencia que *E. histolytica* utiliza para adherirse y degradar la mucosa del hospedero. Los componentes celulares, que son fundamentales para la virulencia de *E. histolytica* y que le permiten la adhesión, está mediada por varias proteínas de la superficie celular. Una de las adhesinas es un complejo proteico con afinidad específica por galactosa (Gal) o N-acetil-D-galactosamina (GalNAc). El complejo comprende subunidades pesadas (Hgl) y ligeras (Lgl) unidas por un enlace disulfuro y una subunidad intermedia (IgL) postulada para interactuar de forma no covalente. Las subunidades Hgl como IgL tienen afinidad Gal/GalNAc, mientras que la Hgl es una proteína transmembrana que participa en la transducción de señales. Otras de las proteínas involucradas incluyen una proteína de membrana de 220 kDa (L220) con propiedades similares a las lectinas, una proteína de *E. histolytica* rica en serina (SREHP) con una región que interacciona con la membrana y el heterodímero de adhesina/cisteína proteasa EhCPADH112 que tiene varios dominios que atraviesan la membrana. Todas estas moléculas de adhesión se han propuesto como dianas de vacunas. *E. histolytica* puede secretar varios factores en el medio extracelular, incluidas las cisteína proteasas (CP), la fosfatasa ácida secretada (PS) y el péptido formador de poros o amebaporo (PFA), el cual ocasiona un shock osmótico en la célula. Curiosamente, las amebas también pueden secretar fosfatasa ácida unida a la membrana (PM). Estos factores se liberan de forma constitutiva (CP, PA) o de forma regulada (PFA) en respuesta al contacto con la célula hospedera modificado de Laughlin & Temesvari, (2005) (creado en Biorender.com).



2.2 Respuesta inmune contra *E. histolytica*

La respuesta inmune en cualquier infección se inicia con la respuesta inmune innata. Aquí participan diversas moléculas y células, así como barreras físicas como la mucina secretada por las células en el intestino y el epitelio que impide la entrada de patógenos al organismo. Este tipo de mecanismos se encuentran vigilantes en circulación sanguínea y tejidos del cuerpo, para que en el momento en que se encuentren con algún patógeno, estas se activen rápidamente para controlar o generar una respuesta más específica. En el caso de las infecciones por protozoarios, específicamente por *E. histolytica*, este sistema ha sido estudiado para poder comprender los mecanismos envueltos para atacar infecciones por este parásito.

Una problemática en la infección con *E. histolytica* es que ésta posee en su estructura diversos factores de virulencia que obstaculizan el correcto funcionamiento del sistema inmunológico del hospedero, favoreciendo su permanencia en el organismo infectado. Prueba de ello es que el haber padecido amebiasis intestinal en una ocasión, no genera inmunidad para infecciones posteriores, incluso hay casos reportados de pacientes que han tenido AHA en más de una ocasión (Irusen *et al.*, 1992).

Diversos estudios han reportado que, ante la infección con *E. histolytica*, las células del intestino liberan potentes quimioatrayentes y citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1, 6, 8 y 10, desencadenando una inflamación aguda (Sharma *et al.*, 2005). Estudios similares, han mostrado que la infección por este parásito en el parénquima hepático promueve la producción de prostaglandina E2 (PGE₂), la cual suprime a los macrófagos para responder al IFN- γ aumentando la producción de citocinas pro inflamatorias, así como la subsecuente disminución del MHC-II, por lo cual no pueden eliminar a los trofozoítos (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016; Sánchez-Ramírez *et al.*, 1997). Incluso se ha llegado a sugerir que la respuesta inmune innata parece contribuir al daño observado en la infección intestinal y hepática con *E.*



histolytica, ya que ocurre una producción de NO en exceso el cuál es más dañino para el hospedero que para el parásito (Ramirez-Emiliano *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se ha observado que la liberación de algunas citocinas y quimiocinas producidas por las células de la respuesta inmune innata, colaboran en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Por ejemplo, la IL-18 es secretada en el intestino por macrófagos y células NK durante la infección con *E. histolytica*. Esta participa en la activación de células linfoides innatas de tipo 1 (ILC-1) las cuales secretan $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$, dos citocinas proinflamatorias que a su vez generan la activación de un tipo de respuesta Th1. Esto favorece la producción de $\text{IFN-}\gamma$, el cual activa macrófagos, mismos que se encargan de eliminar al parásito mediante la producción de óxido nítrico (NO) (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011). Debido a esto la respuesta Th1 es ideal en la eliminación del parásito, lo cual es punto clave en la generación de una vacuna eficaz (Guo *et al.*, 2011a).

Se ha reportado que pacientes asintomáticos infectados con *E. histolytica* presentan niveles elevados de $\text{IFN-}\gamma$, en tanto que pacientes que cursan con la infección activa presentan altos niveles de IL-4, una citocina propia de una respuesta de tipo Th2 (Sánchez-Guillén *et al.*, 2002). Esto demuestra que la respuesta celular es un factor importante en el desarrollo de la infección y que la respuesta humoral no es efectiva frente a este parásito.

2.3 Respuesta inmune celular contra *E. histolytica*

Trabajos enfocados al estudio de la respuesta humoral destacan que el componente principal responsable de la respuesta inmune intestinal contra la infección amebiana son las inmunoglobulinas secretadas. Se demostró que la inmunoglobulina IgA anti-Gal/GalNAc reduce la colonización de trofozoítos en el colon. Curiosamente, la CP asociada a la superficie de *E. histolytica* (EhCP-A5) escinde la IgA humana. Los CP amebianos son capaces de escindir ambos isotipos, es decir, IgA1 e IgA2 (Rashidul



Haque et al., 2001, 2006). Además, las CP amebianas también pueden inactivar la IgG circulante y, por lo tanto, se cree que están involucradas en la supervivencia durante la invasión de tejidos y la propagación extraintestinal. La degradación de la IgG en la sangre podría evitar la activación de la vía clásica del sistema del complemento y las células inmunes que albergan los receptores Fc (Que & Reed, 2000).

Es por ello que el establecimiento de una respuesta inmune celular adecuada ha sido tema de estudio en las infecciones parasitarias desde hace varias décadas. Campbell & Chadee en 1997, determinaron el patrón de citocinas durante la amebiasis hepática en jerbos. Luego, evaluaron la proliferación de células de bazo y ganglios linfáticos hepáticos la producción de IL-2 (un marcador Th1), IL-4 (un marcador Th2) y TNF- α en respuesta a concanavalina A y a antígeno amebiano *in vitro*. El desarrollo temprano del absceso (día 5 después de la inoculación) coincidió con la generación de IL-2, IL-4 y baja producción de TNF- α , así como fuertes respuestas linfoproliferativas, mientras que la supresión de la producción de IL-4 y la proliferación ocurrieron durante la enfermedad aguda (día 20). La respuesta proliferativa y la producción de IL-2 aumentaron en los días 30 y 60 después de la inoculación, pero los niveles de IL-4 se mantuvieron bajos. Los animales tratados con 200 mg/kg de metronidazol al día 20 después de la inoculación demostraron una alta producción de IL-2 y baja de IL-4 y resistencia a la reinfección. Mientras que la amebiasis hepática aguda en los jerbos se acompaña de inmunosupresión transitoria, la infección tardía y la resistencia a la reinfección se asocian con la producción de IL-2 pero baja producción de IL-4 y TNF- α (respuesta similar a Th1)(Campbell & Chadee, 1997).

Como ya se mencionó, la respuesta inmune celular es un factor de suma importancia para la eliminación de *E. histolytica*, se sabe que la respuesta celular del tipo Th1 favorece la producción de IFN- γ producido por los linfocitos Th1, mismo que activa macrófagos induciendo la producción de óxido nítrico (NO) e IFN- γ , involucrados en la eliminación de *E. histolytica*.

Con la finalidad de demostrar la base inmunológica de la respuesta inmunitaria provocada por la lectina Gal/GalNAc, Ivory & Chadee, (2007), inmunizaron ratones BALB/c con 1 μ g de la Gal/GalNAc por vía intraperitoneal. De estos animales se extrajeron células dendríticas (CD) derivadas de médula ósea a las que estimularon *in vitro* con la Gal/NAC y analizaron la activación y maduración de las CD mediante la expresión de las moléculas CD80, CD86, CD40 y MHC II en la superficie celular mediante citometría de flujo. Concluyeron que la Gal/GalNAc ayuda a la activación y maduración de las CD. En los sobrenadantes de los cultivos de las CD se demostró que las células produjeron IFN- γ y baja producción de IL-4, lo cual sugirió una respuesta de tipo Th1. Posterior a esto, a partir del bazo de los animales inmunizados con la misma proteína se obtuvieron linfocitos T y los co-cultivaron con CD estimuladas con la Gal/NAC y demostraron que los linfocitos fueron capaces de proliferar en presencia de estas células, lo que sugirió que esta proteína es capaz de activar directamente a las CD e inducir una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T (Ivory & Chadee, 2007)..

La importancia de la producción de IFN- γ en la infección por *E. histolytica* ya había sido demostrado en experimentos por ese mismo grupo de investigación. Lin *et al.*, en 1994, extrajeron macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y los estimularon *in vitro* con TNF- α e IFN- γ . Posteriormente, expusieron estas células en co-cultivo con trofozoítos de *E. histolytica* y demostraron que la viabilidad de los trofozoítos disminuía en relación con la capacidad de los macrófagos de producir NO en el medio por un mecanismo dependiente de la producción de TNF- α e IFN- γ (Lin *et al.*, 1994). Años más tarde, Séguin *et al.*, (1997) inmunizaron ratones BALB/c con la Gal/GalNAc y aislaron macrófagos derivados de médula ósea a los que estimularon *in vitro* con la Gal/GalNAc demostrando que esta lectina era capaz de inducir la producción de TNF- α e IFN- γ con la subsecuente producción de NO (Figura 3) (Séguin *et al.*, 1997)..

Por otra parte, los primeros estudios sobre la inmunogenicidad de la L220 de *E. histolytica*, la cual se abordará con mayor detalle en el próximo apartado, demostraron que esta lectina es capaz de desencadenar una alta producción de



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

anticuerpos, favoreciendo una respuesta humoral al generar un patrón de citocinas de tipo Th2. Sin embargo, esta misma proteína al ser hidrolizada y obtener varios péptidos específicamente de 100 y 80 kDa puede generar cambios en el patrón de citocinas en ratones BALB/c inmunizados, promoviendo preferentemente una respuesta Th1, misma que es esencial para el ataque contra este parásito (Talamas-Rohana *et al.*, 1995a).

Realizar estudios enfocados al tipo de respuesta celular contra la amiba es de interés ya que esto permitiría el desarrollo de una vacuna eficaz para combatir infecciones por este parásito.

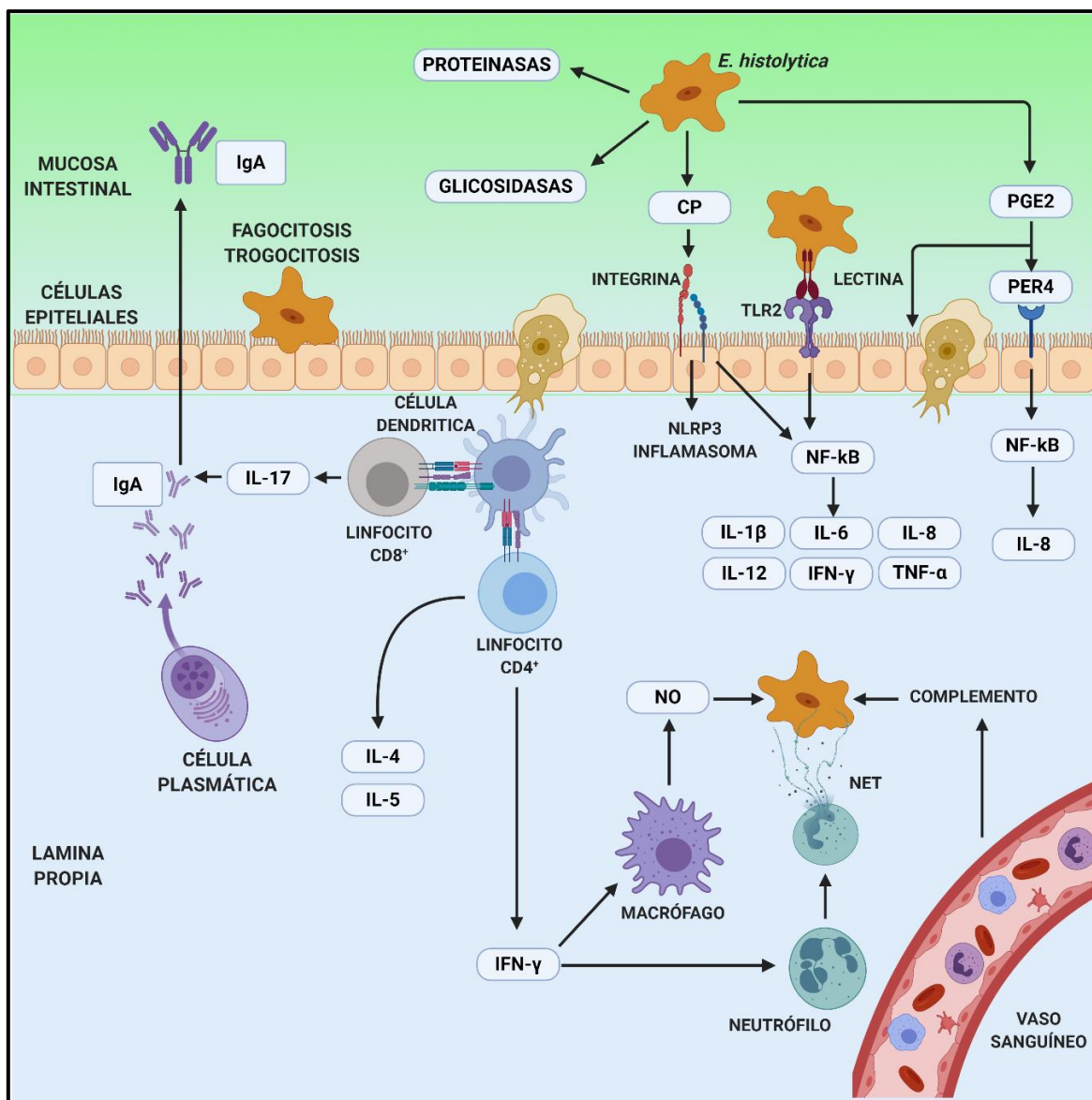


Figura 3. Respuesta inmune inducida contra *E. histolytica*. En el lumen intestinal, las enzimas (glicosidasas y proteinasas) secretadas por *E. histolytica* están involucradas en la degradación de la mucina. La proteinasa (CP) se unen y activan las integrinas en las células endoteliales, lo que lleva a la formación del inflammasoma NLRP3. Además, la lectina Gal/GalNAc (lectina) en la ameba se une al receptor tipo Toll 2 (TLR2), lo que conduce a la activación de NF-κB y la liberación de citocinas inflamatorias, incluida la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ y TNF-α. La PGE2 secretada por la ameba irrumpe las uniones que hay entre las células endoteliales. También se une al receptor 4 de prostaglandina E (PER4), y activa NF-κB con lo cual estimula la secreción de IL-8. La fagocitosis y la trogocitosis también participan en la eliminación de las células epiteliales y la invasión del tejido. Los trofozoítos infiltrantes son atacados por el complemento de la circulación. Las amebas son



reconocidas por las células dendríticas, que luego activan las células T CD4+ y CD8+, para desarrollar una respuesta inmune celular. Las células T CD4+ producen IFN- γ , IL-4 e IL-5, mientras que las células T CD8+ producen IL-17. La IL-17 mejora la secreción de anticuerpos IgA en la luz del colon. El IFN- γ estimula a los macrófagos para que produzcan óxido nítrico (NO) y neutrófilos para liberar trampas extracelulares (NET). El NO puede matar amebas directamente, mientras que los NET puede atraparlas e inmovilizarlas. Las citocinas con una función protectora contra la amebiasis son IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17 e IFN- γ . Mientras que las asociadas con manifestaciones de la enfermedad son la IL-4, IL-5 Y TNF- α . Modificado de Uribe-Querol & Rosales, (2020) (Creado en Biorender.com).

2.4 Propuestas de vacunas

Con el fin de combatir la amibiasis, numerosas investigaciones se han enfocado a estudiar diferentes proteínas de *E. histolytica* como potenciales antígenos para la fabricación de una vacuna.

Estos trabajos han evaluado la funcionalidad de distintas vacunas con proteínas provenientes de *E. histolytica*. Zhang *et al.* (1996), obtuvieron cADN de la proteína rica en serina (SREHP) de *E. histolytica*, lo clonaron y lo ligaron a un vector de expresión pCR3.1 y obtuvieron un plásmido pCR-SREHP el cual expresaron en células Top10FCells. Los plásmidos purificados fueron aplicados intramuscularmente en ratones C.B-17 y jerbos a una sola dosis de 200 μ g. Posterior a esto, evaluaron la respuesta antigénica en los animales inmunizados mediante ELISA y detectaron niveles elevados de IgG e IgA en heces, saliva y suero. Por el contrario, los animales inmunizados solo con el pCR3.1 no mostraron significancia en la producción de anticuerpos. Por otro lado, evaluaron la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en cultivo y de esplenocitos de animales inmunizados y estimulados con trofozoítos de *E. histolytica* atenuados con calor. Los resultados mostraron que las células provenientes de animales inmunizados con el pCR-SREHP tuvieron una proliferación significativa comparada con las células de animales inmunizados sólo con pCR3.1. También demostraron su efectividad como vacuna en un modelo de



formación del AHA donde los resultados revelaron una protección de 78% (Zhang & Stanley, 1996).

En otro trabajo realizado por Barroso *et al.* (2013), se clonó una región de la cadena pesada de la lectina Gal/GalNAc, denominada LecA. Posterior a esto, demostraron que el antisuero anti-LecA proveniente de animales inmunizados con la LecA, inhibe la adherencia de trofozoítos a las células de ovario de hámster chino (CHO) en cultivo. Lo cual indicó que los anticuerpos anti-LecA reconocieron la lectina de superficie en los trofozoítos e impidieron la unión de estos a las células CHO. Posteriormente, inmunizaron ratones CBA/J con 20 µg de LecA en adyuvante EM014 vía subcutánea y fueron retados intracecalmente con 2×10^6 trofozoítos de *E. histolytica*. A la semana post-infección, los animales fueron sacrificados y se recolectó el contenido del ciego para determinar la carga de antígeno mediante pruebas de ELISA. Los resultados mostraron que los animales vacunados tuvieron una disminución significativa de la infección comparados con un grupo control sin vacuna, concluyendo que esta vacuna tuvo un grado de protección del 60% (Barroso *et al.*, 2014).

Martínez *et al.* 2009, generaron una vacuna de ADN a partir de los genes *Ehcp112* y *Ehadh112*, los cuales codifican para la proteína de superficie EhCPADH, formada por la adhesina (EhADH112) y su cisteín proteasa adjunta (EhCP112), ambas involucradas en la virulencia del parásito. Los resultados mostraron una protección de 90% caracterizada por un perfil bajo en los niveles de anticuerpos y una elevada respuesta de tipo Th1 crucial para la eliminación de este parásito (Martínez *et al.*, 2009a).

Los resultados obtenidos en vacunas de ADN parecen prometedores, algunas de las desventajas de utilizar este tipo de vacunas es que la inyección del material genético pudiera generar la integración al azar de ese ADN y activar oncogenes o inactivar supresores de oncogenes, así como que la expresión de bajos niveles de antígeno y la constante presentación al sistema inmune por largos periodos puede generar estados de tolerancia o hiperinmunidad (Kofta & Wedrychowicz, 2001).



En otro trabajo estudiaron la respuesta inmune de un péptido recombinante de EhADH112 *in vivo* e *in vitro* en un modelo de hámster y en cultivos de esplenocitos. Los animales fueron inmunizados 3 veces con intervalos de 14 días con el péptido en adyuvante de Freund. Se demostró tener una eficacia del 60% en el modelo susceptible de hámster al mediar una respuesta humoral. Los anticuerpos anti-EhADH112 impidieron la adherencia, fagocitosis y disrupción de células en cultivo por trofozoítos, ya que estos no pudieron adherirse a las membranas celulares (Martínez-López *et al.*, 2004).

También destacan trabajos donde utilizaron la lectina Gal/NAC con la finalidad de obtener una vacuna contra *E. histolytica*, como fue el realizado por Min *et al.* (2016). En dicho trabajo inmunizaron un grupo de hámsteres con una vacuna fabricada a base de un fragmento recombinante de la Gal/GalNAc, que incluye regiones de la Igl y de la C-Igl de dicha proteína, e indujeron el AHA. Los resultados mostraron que esta vacuna presentó una protección del 92 y 93%, respectivamente para prevenir la formación del AHA. La identificación de la expresión del mRNA de citocinas en esplenocitos estimulados en cultivo demostraron que la respuesta estuvo mediada por IL-10, 6, 4, IFN- γ y TNF- α . Adicionalmente, se encontró una respuesta humoral significativa con niveles elevados de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados, los cuales inhibieron la adherencia de los trofozoítos a las células del hospedero en un 80% e indujeron la lisis de trofozoítos mediada por el sistema de complemento en un 80% más, respecto al grupo control (Min *et al.*, 2016).

Otra de las proteínas que se ha propuesto como candidato para la producción de una vacuna es la L220. Esta es una proteína de membrana con propiedades de lectina que contiene 9% de carbohidratos, es rica en residuos hidrofóbicos, ha mostrado ser altamente inmunogénica en ratones, hámsteres y conejos, además de ser capaz de aglutinar eritrocitos humanos (Rosales-Encina *et al.*, 1987). Talamás-Rohana *et al.* (1995) realizaron estudios con los diferentes péptidos de la L220 obtenidos mediante hidrólisis con N-clorosuccinimida-urea. Los resultados

mostraron que al estimular los esplenocitos *in vitro* con los péptidos de 100 y 80 kDa derivados de la L220 indujeron proliferación en esplenocitos provenientes de animales previamente inmunizados con dichos péptidos, así como con la L220, secretando en mayor concentración IL-2 e IFN- γ correspondiente a una respuesta Th1. Estos resultados sugieren que estos péptidos podrían ser buenos candidatos para la generación de una vacuna (Talamas-Rohana *et al.*, 1995a).

La respuesta celular juega un papel importante en la eliminación y control de la amiba, misma que puede ser un componente crítico en el desarrollo satisfactorio de una vacuna contra esta infección, es por lo que es importante innovar en el diseño de estas, una opción prometedora es el uso de nanopartículas.

2.5 Nanotubos de carbono (CNTs).

Los nanotubos de carbono (CNTs) son nanoestructuras conformadas por átomos de carbono perfectamente estructurados, unidos mediante enlaces sp^2 , que al unirse forman un tubo con un diámetro en la escala de nanómetros. Los CNTs pueden ser de dos tipos: nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs; del inglés *single wall carbon nanotubes*) y nanotubos de pared múltiple (MWCNTs; del inglés *multi wall carbon nanotubes*). Una de las características de estas nanopartículas es que pueden ser funcionalizadas o dopadas, refiriéndose con esto a una modificación estructural de sus paredes mediante la adición de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los CNTs. Esta funcionalización produce cambios en las propiedades físicas de estas nanopartículas, como en la solubilidad y dispersión, características importantes ya que esto les permiten mejorar las interacciones con otras moléculas biológicas.

La funcionalización de los CNTs se puede realizar a través de una unión covalente o iónica (Hirsch, 2002). Los extremos curvados de los CNTs permiten que la unión sea, preferencialmente, sobre esta zona, ya que se considera la zona más reactiva del CNTs en comparación a sus paredes (Sinnott, 2002).

Existen diferentes protocolos que nos permiten funcionalizar moléculas a la estructura de los CNTs, dentro de las cuales destacan la oxidación química mediante el baño de estas nanopartículas con ácido nítrico y ácido sulfúrico, a fin de purificar su estructura y exponer grupos funcionales como ácidos carboxílicos e hidroxilos, que sirven como puente para la adición de otras moléculas como proteínas. También estos CNTs pueden ser funcionalizados mediante uniones no covalentes mediante la adsorción de moléculas surfactantes, compuestos aromáticos y polímeros que no alteran la estructura de los CNTs (Andrade Guel *et al.*, 2012)

Son muy variadas las técnicas de funcionalización que existen para los CNTs. Sin embargo, todas tienen el mismo fin de la adición de moléculas a las paredes de los CNTs (Figura 4).

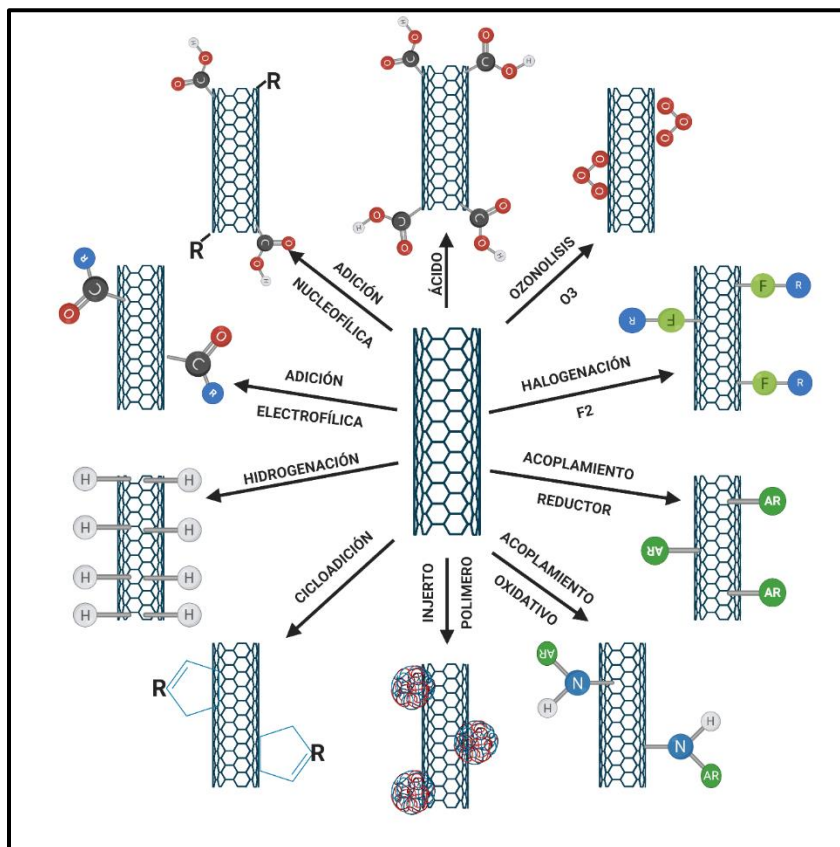


Figura 4. Funcionalización de CNTs a través de diversos métodos químicos. Modificado de Andrade *et al.*, (2012) (Creado en Biorender.com).



La funcionalización química involucra la formación de un enlace covalente entre la molécula de interés y los grupos funcionales formados por la purificación en los CNTs. Este proceso puede realizarse por reacción con algunas moléculas que poseen una alta reactividad química como una amidación entre el grupo carboxilo y el grupo amino, otra estrategia consiste en la preparación de CNTs con grupos maleimida, mismos que reaccionan fácilmente con grupos tiol presentes en las cisteínas formando un enlace covalente (Prato *et al.*, 2008).

Estas características de funcionalización permiten que las nanopartículas puedan servir como acarreadores de diferentes moléculas como drogas, ácidos nucleicos, proteínas o de antígenos específicos, entre otros. Específicamente, la funcionalización con antígenos ha sido propuesta para la fabricación de nanovacunas, poniendo especial interés en aquellos CNTs funcionalizados de manera covalente, ya que este tipo de unión hace más estable a la molécula unida a los CNTs.

2.6 Vacunas a partir de CNTs

Una vez funcionalizados, los CNTs pueden penetrar la membrana celular o ser endocitados por las células. Después de ingresar a la célula, los CNT se ubican principalmente dentro de los endosomas y lisosomas celulares, también pueden viajar a través de varias barreras celulares a través de difusión pasiva e incluso ingresar al núcleo (Figura 5) (Peretz & Regev, 2012).

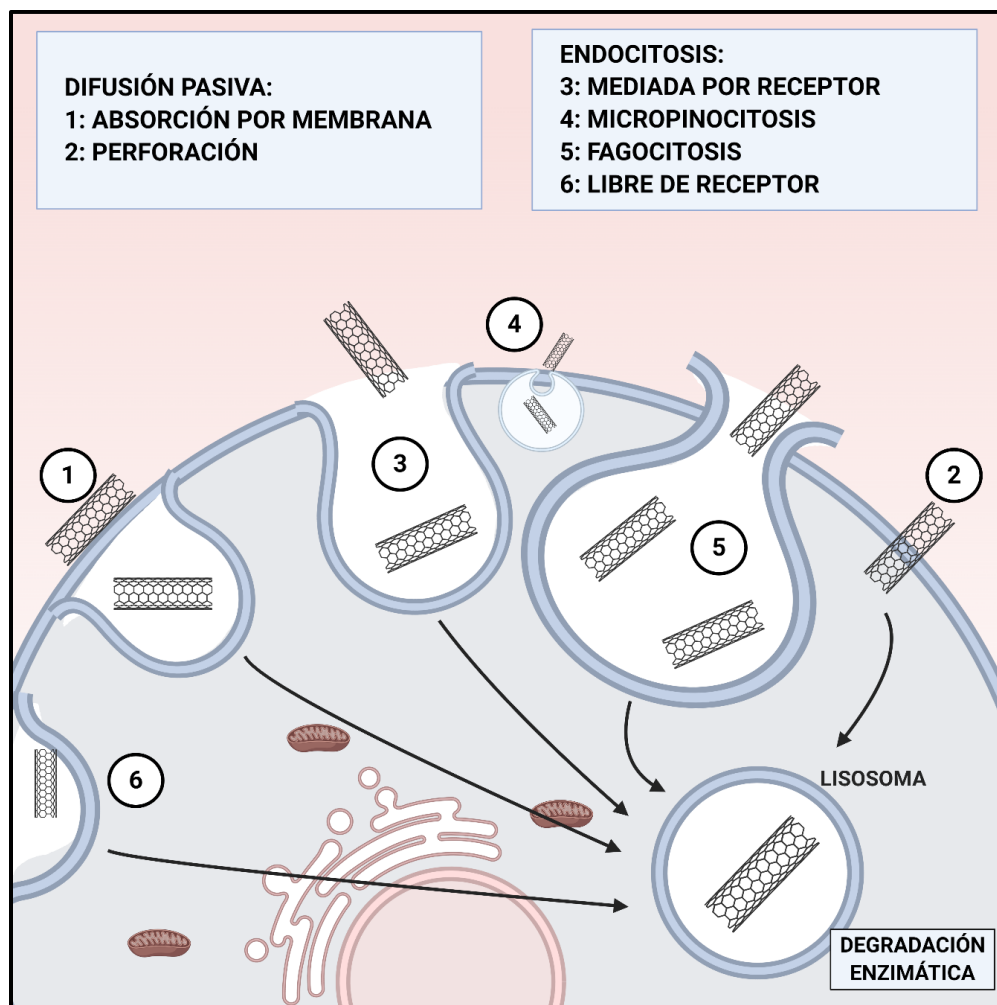


Figura 5. Mecanismos de captación celular de CNTs. Existen dos vías por las cuales los CNTs pueden ser internalizados a la célula, estos son la difusión activa que es dependiente de energía y la pasiva independiente de energía. La vía activa se produce principalmente por endocitosis, donde los CNTs son internalizados dentro de endosomas antes de que sean transportados a los lisosomas, localizados en la región perinuclear de las células. Hay varias vías por las cuales los CNTs son internalizados y estas comprenden la micro pinocitosis, endocitosis mediada por caveolas y endocitosis dependiente de clatrina. Por otro lado, la fagocitosis permite la captación de CNTs de más de 1 μm de longitud y participan macrófagos, siendo esta vía dependiente de energía. Los macrófagos y las células endoteliales pueden liberar micro vesículas que contienen CNTs en condiciones de estrés. Este mecanismo elimina CNTs exógenos y citotóxicos al inducir la formación de micro vesículas autofágicas. Algunos investigadores también encontraron que los CNTs pueden degradarse enzimáticamente dentro de las células y los CNTs permanecen sin cambios, mientras que se observaron pequeñas aglomeraciones dentro de los macrófagos, donde se degradan gradualmente en los lisosomas modificado de Huang, (2020) (Creado en Biorender.com).



Dado lo anterior, se ha despertado el interés en estudiar la respuesta por parte del sistema inmunológico al reconocer estas nanopartículas. Dutt & Saxena *et al.*, (2020) demostraron que los CNTs podrían utilizarse como un adyuvante para mejorar la respuesta de anticuerpos, especialmente en el desarrollo de vacunas. Para esto se utilizaron SWCNTs funcionalizados con ovoalbúmina y se cuantificó la producción de anticuerpos en ratones C57BL/6 inmunizados con estos CNTs, esto a través de la interacción de los SWCNTs con linfocitos B en cultivo; los resultados mostraron que los linfocitos B de los animales inmunizados con los CNTs internalizaron más ovoalbúmina que los expuestos a ovoalbúmina sola, colocando a los CNTs como un buen adyuvante (Dutt & Saxena, 2020)..

Además, la funcionalización de CNTs con proteínas y péptidos ha sido demostrada utilizando diferentes métodos. Fu *et al.* (2002) funcionalizaron CNTs con albúmina sérica bovina mediante una amidación con una diamida activada (Fu *et al.*, 2002). Zeinali *et al.* (2009) funcionalizaron los CNTs con un derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) mediante un enlace covalente con la finalidad de ser aplicados como nanovacunas. En su estudio demostraron que el conjugado de CNTs-PPD promueve una alta producción de IL-12, IFN- γ y NO, citocinas específicas de una respuesta Th1, las cuales se detectaron en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c previamente inmunizados con estas nanopartículas y estimulados con CNTs-PPD. Otro dato de interés, fue que la respuesta inducida en este modelo con adyuvante de Freund, desvió la respuesta hacia un tipo humoral, en comparación a la utilización de CNTs-PPD solos (Zeinali *et al.*, 2009a).

Los trabajos antes citados nos hablan del potencial de estas nanopartículas para su uso en el diseño y producción de vacunas, adicionalmente, es necesaria una evaluación de la citotoxicidad de estas partículas para poder ser utilizadas de forma segura.

Actualmente se sabe que la citotoxicidad de los CNTs funcionalizados es dependiente del estado de pureza, del procesamiento llevado a cabo para la



purificación, así como de la molécula funcionalizada en estas partículas (Montes-Fonseca *et al.*, 2012b, 2015). Se han realizado estudios de toxicidad *in vivo* e *in vitro* de CNTs funcionalizados con diferentes moléculas para demostrar su seguridad en su uso como vacunas.

Guzmán-Mendoza *et al.* (2020) evaluaron la toxicidad de distintos tipos de CNTs inoculados por vía intravenosa en ratones BALB/c y realizaron un análisis histológico y bioquímico. El análisis histológico en hígado, pulmón, riñón y bazo no reveló daño evidente ni acumulación de estas nanopartículas en los tejidos analizados; el análisis de los parámetros bioquímicos mediante la actividad de las enzimas AST, ALT, LDH, y la concentración de urea y creatinina en suero no mostró diferencias significativas con respecto al control en el caso de los CNTs purificados, por lo cual se dedujo que estas nanopartículas no inducen una toxicidad sobre el organismo al ser purificadas (Guzmán-Mendoza *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Montes-Fonseca *et al.*, (2012) funcionalizaron CNTs con la L220 a través de un enlazador N-Boc-2,2-dioxietileno dietilamina y evaluaron su citotoxicidad en una línea celular de macrófagos (MOs) J774. Los resultados mostraron que los CNTs funcionalizados con la L220 no indujeron citotoxicidad ni apoptosis, lo cual sugirió que estos CNTs pueden ser utilizados en la creación de una nanovacuna dada su baja toxicidad y la buena interacción que existe con los MOs (Montes-Fonseca *et al.*, 2012a). Posteriormente, Guzmán-Mendoza *et al.*, (2018) demostraron que los P-CNTs funcionalizados mediante esterificación enzimática con los péptidos obtenidos por la hidrólisis química de la L220 de *E. histolytica* no inducen citotoxicidad en macrófagos de la línea celular J774. Por el contrario, como resultado de la interacción de los macrófagos con los PL220-CNTs, éstos presentaron una arquitectura celular correspondiente a células activadas, con prolongaciones citoplasmáticas (tipo pseudópodos) y la presencia de estructuras similares a fagosomas, postulando a estos PL220-CNTs como excelentes candidatos para la creación de una nanovacuna contra la amibiasis. Recientemente, Velarde *et al.*, (2019) realizaron un protocolo en el cual se inmunizaron ratones BALB/c con 25 µg de estos mismos PL220-CNTs por vía subcutánea, bajo un



protocolo de inmunización de 3 dosis (a los días 0 para la primera inmunización y refuerzos a los días 7 y 21). En este trabajo se observó que estas nanopartículas promueven una baja respuesta de tipo humoral, con bajos títulos de anticuerpos (1:50), comparado a los títulos de anticuerpos inducidos por la L220 sola bajo el mismo protocolo (1:1000). Adicionalmente, en un sistema *in vitro* se evaluó la proliferación de esplenocitos de ratones previamente inmunizados y estimulados con diversos antígenos. En este sistema, los PL220-CNTs fueron capaces de inducir la proliferación de los esplenocitos en un 500% respecto al grupo control sin estímulo, lo cual sugiere un reconocimiento del antígeno con una posible generación de células T de memoria *in vivo*. Sin embargo, el patrón de citocinas generado en este modelo no se analizó, lo cual sería de ayuda a el fin de conocer el tipo de respuesta celular Th generado (Velarde-Calderón, 2019).

Por ello, surge la necesidad de llevar a cabo estudios enfocados en determinar el tipo de respuesta celular que estos PL220-CNTs producen en un modelo *in vivo* y determinar su capacidad para generar una respuesta inmune celular de memoria de tipo Th1 que pueda combatir infecciones por *E. histolytica*. Además, es necesario evaluar la efectividad de esta vacuna para prevenir la infección en un modelo susceptible y así proponer el uso de estos PL220-CNTs como nanovacunas.



JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos por obtener una vacuna capaz de generar una respuesta inmunológica específica de tipo Th1, eficaz para combatir la amibiasis, a la fecha no se han obtenido resultados concluyentes. Lo cual implica costos para el sector salud en tratamiento e incapacidad, en la población infantil y adulta, principalmente.

Con la finalidad de solucionar este problema, se ha propuesto el uso de *PL220*-CNTs, mismos que han demostrado inducir una alta proliferación celular con una baja producción de anticuerpos en un modelo de ratón; sin embargo, se desconoce el tipo de respuesta celular, y su eficacia como vacuna en un modelo susceptible. Por lo cual es de especial interés evaluar el tipo de respuesta inmune inducida por estos *PL220*-CNTs *in vivo* en modelos animales retados con trofozoítos de *E. histolytica* y así poder confirmar su uso como vacuna.



III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el tipo de respuesta inmune inducida por nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos derivados de la L220 de *E. histolytica* (PL220-CNTs) en diferentes modelos animales y determinar la eficiencia de la inmunización en el desarrollo de AHA en un modelo susceptible.

3.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el tipo de respuesta inmune (Th1/Th2/Th17) por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con PL220-CNTs.
2. Evaluar el daño pulmonar en ratones BALB/c inmunizados con PL220-CNTs mediante análisis histopatológico.
3. En hámsteres inmunizados con PL220-CNTs analizar:
 - La respuesta inmune (Th1/Th2/Th17) en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos a través de la cuantificación de citocinas por citometría de flujo.
 - La respuesta inmune humoral mediante Western blot.
 - La eficiencia de protección para la formación de AHA en hámsteres retados con trofozoítos de *E. histolytica*.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

HIPÓTESIS

Los CNTs funcionalizados con péptidos derivados de la L220 de *E. histolytica* (PL220-CNTs) inducirán una respuesta inmune celular específica correspondiente a un patrón cooperador de tipo 1 en ratones y hámsteres inmunizados caracterizado por un aumento en la producción de IFN- γ . Adicionalmente, los hámsteres inmunizados con los PL220-CNTs tendrán un menor desarrollo de AHA al ser retados con trofozoítos de *E. histolytica* en comparación a los grupos control.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Entamoeba histolytica*.

La cepa patógena HM1: IMSS de *Entamoeba histolytica* se cultivó en forma axénica en medio TYI-S33 complementado con 20% de suero bovino adulto, 1% de penicilina/estreptomicina y vitaminas Diamond (5:1). Los cultivos en fase logarítmica (48-60 h) se depositaron en baño de hielo (4 °C) por 15 min para despegar los trofozoítos de las paredes del tubo. Finalmente, un volumen de 0.1 mL de la suspensión celular fue añadida a un tubo con 10 mL de medio de cultivo complementado y se incubó a 37 °C para continuar con el mantenimiento de la cepa.

Para la purificación de proteínas, los trofozoítos provenientes de un tubo con crecimiento confluyente se sembraron en un frasco de cultivo de 50 mL. Los tubos con cultivos en fase logarítmica se depositaron en un baño de hielo por 15 min para despegar los trofozoítos de las paredes de éstos. Luego, el contenido de todos los tubos se recuperó en un tubo cónico de 50 mL estéril, seguido de una centrifugación a 1500 rpm por 5 min a 4 °C. Posteriormente, la pastilla celular obtenida se resuspendió en 50 mL de medio de cultivo con suero bovino adulto vitaminado. Finalmente, esta suspensión celular se repartió en 5 frascos de cultivo y se incubaron a 37 °C hasta crecimiento confluyente.

4.2 Determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratón y hámster mediante citometría de flujo.

Las concentraciones de citocinas (IL-2, IL4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-10) se analizaron en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c y hámsteres inmunizados con PL220-CNTs mediante citometría de flujo utilizando el



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

kit (BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, RUO) en el equipo BD Accuri C6 Plus y BD LSRFortessa™.

El kit comercial se utilizó de la siguiente manera:

- Estándares de citocinas Th1/Th2/Th17 como curva de calibración:

Los viales con las microesferas liofilizadas se transfirieron a un tubo cónico de polipropileno de 15 mL, se añadieron 2 mL del diluyente y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Después, las microesferas se reconstituyeron mediante pipeteo suave evitando utilizar vortex (esto correspondió al Top Standard). Posterior a esto, se etiquetaron tubos de 12 x 75 mm con las siguientes etiquetas: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256 (correspondiente a las diluciones de la curva estándar), una vez realizado esto, se transfirieron 300 μ L de diluyente en cada uno de los tubos etiquetados. Realizado esto, se añadió 300 μ L del Top Standard al tubo 1:2 y se mezcló mediante pipeteo suave, una vez realizado esto, se transfirieron 300 μ L del tubo 1:2 al tubo 1:4 siguiendo la misma metodología anteriormente descrita y así sucesivamente hasta el tubo 1:256; también se preparó un tubo solo con diluyente, que fungió como el control negativo con concentración 0 pg/mL.

- Mezcla de microesferas de captura:

Se determinó el número de ensayos a realizar, incluyendo los estándares y los controles (por ejemplo, 8 muestras problema, 9 estándares de citocinas y 1 grupo control, como total 18 tubos a leer). Una vez obtenido esto, se mezclaron las microesferas mediante pipeteo suave, durante 3 a 5 seg, esto se realizó cada vez que se tomó una alícuota del vial a utilizar para asegurarse de que realmente haya una suspensión de las microesferas. Posterior a esto, se colocaron 10 μ L de cada una de las microesferas por cada uno de los tubos a analizar, en un tubo etiquetado como “mezcla de microesferas”, por ejemplo, 10 μ L de microesferas de captura de IL-2 x 18 tubos a analizar = 180 μ L de microesferas de captura de IL-2 serán necesarios.

Los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos congelados a -80°C se descongelaron en baño de hielo y se obtuvieron alícuotas de $100\ \mu\text{L}$, las cuales se analizaron sin diluir.

- El ensayo se realizó de la siguiente manera:

Se mezclaron las microesferas de captura preparadas de las citocinas a determinar, y se añadieron $50\ \mu\text{L}$ a cada uno de los tubos ensayo. Posterior a esto, se añadieron $50\ \mu\text{L}$ de las diluciones estándar de citocinas Th1/Th2/Th17 en los tubos control enlistados en la tabla:

Tabla I. Diluciones de estándares de citocinas.

Tubo etiquetado	Concentración (pg/mL)	Dilución del estándar de citocinas
1	0 ^a	Solo diluyente
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312.5	1:16
7	625	1:8
8	1250	1:4
9	2500	1:2
10	5000	Top Standard

^a, control negativo

Posterior a esto se añadieron $50\ \mu\text{L}$ de muestra problema a tubos etiquetados correctamente. Una vez que se tuvieron todos los tubos a utilizar con las muestras correspondientes en cada uno, se añadieron $50\ \mu\text{L}$ de ficoeritrina (PE) a cada uno de los tubos. Se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente protegidos de la luz. Durante el tiempo de incubación se procedió a programar el equipo para las lecturas de las muestras. Terminado el tiempo de incubación, se colocó 1 mL de amortiguador de lavado a cada uno de los tubos a analizar y se centrifugaron a 200 g durante 5 min. Terminado el tiempo de centrifugado, se retiraron los sobrenadantes cuidadosamente con pipeta, y se añadieron $300\ \mu\text{L}$ de amortiguador de lavado a cada uno de los tubos y se suspendieron las microesferas mediante

pipeteo suave. Una vez obtenidas cada una de las muestras, se colocaron en el equipo una por una para ser leídas (Chen *et al.*, 1999).

4.3 Protocolo de inmunización en hámster

El protocolo de inmunización con las diferentes nanopartículas se realizó en hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*) machos de aproximadamente 4 semanas de edad y 40 g de peso. Los hámsteres se mantuvieron con ciclos de luz y oscuridad de 12 h, temperatura controlada a 21 °C y una humedad de 29%, con agua y comida *ad libitum*. Se formaron 2 grupos independientes conformados a su vez por 3 grupos experimentales (n=6) los cuales se inmunizaron con los diferentes antígenos (Tabla 1). Previo a la inmunización se obtuvo una muestra de sangre venosa vía retroorbital a fin de obtener los sueros pre inmunes. Posterior al sangrado, se realizó la primera inmunización con el antígeno (10 µg en un volumen de 10 µL); las réplicas se realizaron a los 7 y 21 días, y se tomó una muestra de sangre venosa y se infectó a los animales de un solo grupo con trofozoítos de *E. histolytica* 7 días después a la última inmunización (Talamas-Rohana *et al.*, 1995a; Zeinali *et al.*, 2009b).

Tabla II. Formulación del antígeno para cada grupo.

GRUPO	ANTÍGENO	INMUNIZACIÓN	1 ^{er} BOOSTER	2 ^{do} BOOSTER
A	PBS 1x	40 µL	40 µL	40 µL
B	PL220-CNTs	25 µg	25 µg	25 µg
C	L220	10 µg + CFA (1:1 v/v)	10 µg + IFA (1:1 v/v)	10 µg + IFA (1:1 v/v)

*CFA: adyuvante completo de Freund; IFA: adyuvante incompleto de Freund.



4.4 Determinación del grado de protección *in vivo* en hámsteres inmunizados con PL220-CNTs y retados con trofozoítos de *E. histolytica*.

A los hámsteres inmunizados previamente descritos en el punto anterior, una semana después de la última inmunización (día 28), se les tomó una muestra de sangre venosa y se retaron para la formación de AHA según el protocolo que se describe a continuación:

Grupo A: Control positivo de infección, infectado vía intrahepática con 1×10^6 trofozoítos virulentos de *E. histolytica*.

Grupo B: Grupo inmunizado con PL220-CNTs (protocolo en apartado 4.3). Retado vía intrahepática con 1×10^6 trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS.

Grupo C: Control positivo a respuesta humoral: inmunizados con L220 con adyuvante (según el protocolo de inmunización en apartado 4.3) infectados con 1×10^6 trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS.

Al término de los protocolos (día de infección), los animales fueron anestesiados, sangrados y sacrificados para obtener el suero y evaluar la respuesta de anticuerpos. Se realizó laparotomía para observar el hígado y bazo para diseccionarlos, se extrajo el hígado y se calculó el daño como la relación del peso del absceso entre el peso total del hígado completo, así como también se extrajo el bazo para realizar los cultivos primarios de esplenocitos para evaluar la proliferación celular y recabar sobrenadantes para determinar citocinas (Martínez *et al.*, 2009a; Sánchez-Ramírez *et al.*, 1997).



4.5 Determinación de anticuerpos en suero de hámster por inmunoblot

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* fueron lisados en solución de Tris-HCl 10 mM (pH 6.8) conteniendo Triton X-100 al 2% e inhibidores de proteasas: clorhidrato de tosil-L-lisil-clorometano 3 mM (TLCK), N-etilmaleimida 5 mM (NEM), leupeptina 5 mM y aprotinina 5 μ M. El lisado fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferido a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual se activó previamente con metanol. La membrana fue teñida con rojo de Ponceau, para verificar la correcta transferencia, posteriormente se aplicaron 3 lavados con agua destilada para eliminar el rojo de Ponceau. Posteriormente, los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon con amortiguador salino de fosfatos con Tween-20 adicionado con leche en polvo Svelty al 5% (TBST-leche al 5%) durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente (TA), al finalizar el proceso de bloqueo la membrana se lavó 3 veces con TBST durante 10 min en agitación constante para posteriormente incubarla con el suero obtenido de los hámsteres (diluido 1:1000 en TBST-leche al 1%) durante 1 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBST 10 min en agitación constante. Para revelar la membrana se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con biotina (Super Sensitive MultiLink®) el cual se incubó con la membrana durante 20 min a 37°C. Después de 3 lavados con TBST, se incubó la membrana con una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Super sensitive HRP label) durante 20 min a 37°C, seguida de 3 lavados con TBST. Finalmente, la membrana se reveló con 3, 3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) (DAB Chromogen, Sigma) cubriendo la membrana con el reactivo hasta observar las bandas de interés.



4.6 Cultivo primario de esplenocitos de hámster.

Los bazo obtenidos en el punto 4.4 se manipularon en condiciones de esterilidad, y se colocaron sobre una malla de acero inoxidable dentro de una caja Petri con aproximadamente 20 mL de medio RPMI-1640 a 4 °C. El bazo se disgregó con ayuda del émbolo de una jeringa de 10 mL estéril con 10 mL de medio RPMI-1640 a 4 °C, la suspensión celular se filtró a través de una malla de organdí y se colocó en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Las células cosechadas se lavaron dos veces con medio RPMI-1640, centrifugando a las mismas condiciones anteriormente descritas entre cada lavado. Se descartó el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 10 mL de RPMI-1640; una alícuota de 100 µL se mezcló con 20 µL de azul de tripán 0.05% y se determinó la viabilidad en la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de células viables en los cuadrantes de blancos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células totales} = \frac{\text{Células contadas}}{4} \times 1.2 \times 10,000 \times \text{Vol. susp.}$$

Donde:

Células contadas: es la suma del número de células contadas en los cuatro cuadrantes de la cámara.

1.2= factor de dilución de la muestra 8100 µL de células y 20 µL de azul tripán).

10,000= factor de la cámara.

Vol. susp= volumen en el cual se resuspendieron las células (10 mL).

Se ajustó la densidad a 1×10^6 células por pocillo en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (previamente descomplementado), 1% de penicilina/estreptomicina, en placas de 96 pocillos (Martínez *et al.*, 2009a).



4.7 Ensayos de proliferación

Las suspensiones celulares y los ensayos de proliferación se realizaron de acuerdo a lo descrito por (Talamas-Rohana et al., 1995a). Para los ensayos de proliferación, 1×10^6 células se cultivaron por triplicado en 200 μ L de medio y fueron estimuladas con 0.5 μ g de los antígenos (L220 y PL220-CNTs) o 0.5 μ g de Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich) como control positivo de proliferación. Como control negativo se utilizaron células en medio sin estímulo. Se realizó una curva de calibración con 25, 50, 100, 200 y 400 mil células al tiempo cero y posteriormente se evaluó la proliferación celular a las 48 h utilizando el kit Cell Counting Kit-8 de (Sigma-Aldrich) y se realizó la lectura de absorción a 590 nm en un lector de placas Varioskan (Thermo Scientific). La metodología de CCK-8 permite evaluar el índice de proliferación celular, ya que las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias de las células metabolizan la sal de tetrazolium (WST-8) que es un compuesto de color amarillo y soluble en agua, a formazán el cual es insoluble en agua y de color naranja (Mosmann, 1983).

Para las suspensiones celulares se utilizaron 1×10^6 células las cuales fueron cultivadas por duplicado en placas de 96 pozos con 200 μ L de medio y estimuladas con 0.5 μ g de los antígenos (L220 y PL220-CNTs) o ConA como control positivo. Como control negativo se utilizaron células en medio sin estímulo. A las 48 y 120 h los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y almacenados a -80°C para la cuantificación de citocinas.



4.8 Método estadístico

Los datos fueron analizados en el programa estadístico MINITAB 18 y GraphPad Prism 8. Para dicho análisis, se realizó un ANOVA a través de un diseño factorial completamente al azar y una comparación de medias por el método de Dunnett y Tukey. Los datos no paramétricos se analizaron a través de una comparación de medianas con un análisis de Kruskal-Wallis.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.6 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones estimulados con los diversos antígenos.

La determinación del tipo de respuesta Th1/Th2/Th17 en los protocolos de inmunización en ratones BALB/c se realizó a través de la cuantificación de IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 en sobrenadante de cultivos de esplenocitos estimulados *in vitro* con los diferentes antígenos (PBS, P-CNTs, L220, PL220-CNTs y ConA) mediante citometría de flujo.

El grupo control (CTL) corresponde a ratones BALB/c a los cuales se les inoculó PBS y que fungieron como control negativo. Como se observa en la Figura 6, la determinación de citocinas que muestra este grupo es inespecífica, ya que se detectaron todas las citocinas, siendo la IL-17A la que menor concentración mostró. La citocina predominante fue la IL-2 en todos los grupos, pero las concentraciones siempre fueron menores a los 400 pg/mL (Tabla III).

En el caso de los animales inmunizados con P-CNTs, el patrón de citocinas fue similar al del grupo CTL. Sin embargo, hubo un aumento significativo en la producción de IFN- γ en las células estimuladas con los PL220-CNTs respecto al estímulo con PBS (Figura 6 B, Tabla III).

En el grupo de animales inmunizados con la L220, los esplenocitos no presentaron aumento significativo en la producción de citocinas con los diferentes estímulos, más bien se apreció una disminución en sus valores con respecto al control con PBS. En este grupo se encontró que los niveles basales de citocinas con PBS presentaron valores elevados de IL-17A, IL-6, IL-4 e IL-2, sin embargo, no se encontró diferencia estadística debido a la desviación estándar tan grandes en esos cultivos (Figura 6 C, Tabla III).



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

En la producción de citocinas en los cultivos de esplenocitos de animales inmunizados con *PL220*-CNTs se observó un aumento significativo en la secreción de IL-6 e IL-4 con el estímulo con ConA.

Finalmente, el patrón de citocinas en el grupo de animales inmunizados con *PL220*-CNTs administrados con adyuvante mostró un aumento en la producción de IFN- γ e IL-6 al ser estimulados con ConA y con respecto al control sin estímulo.

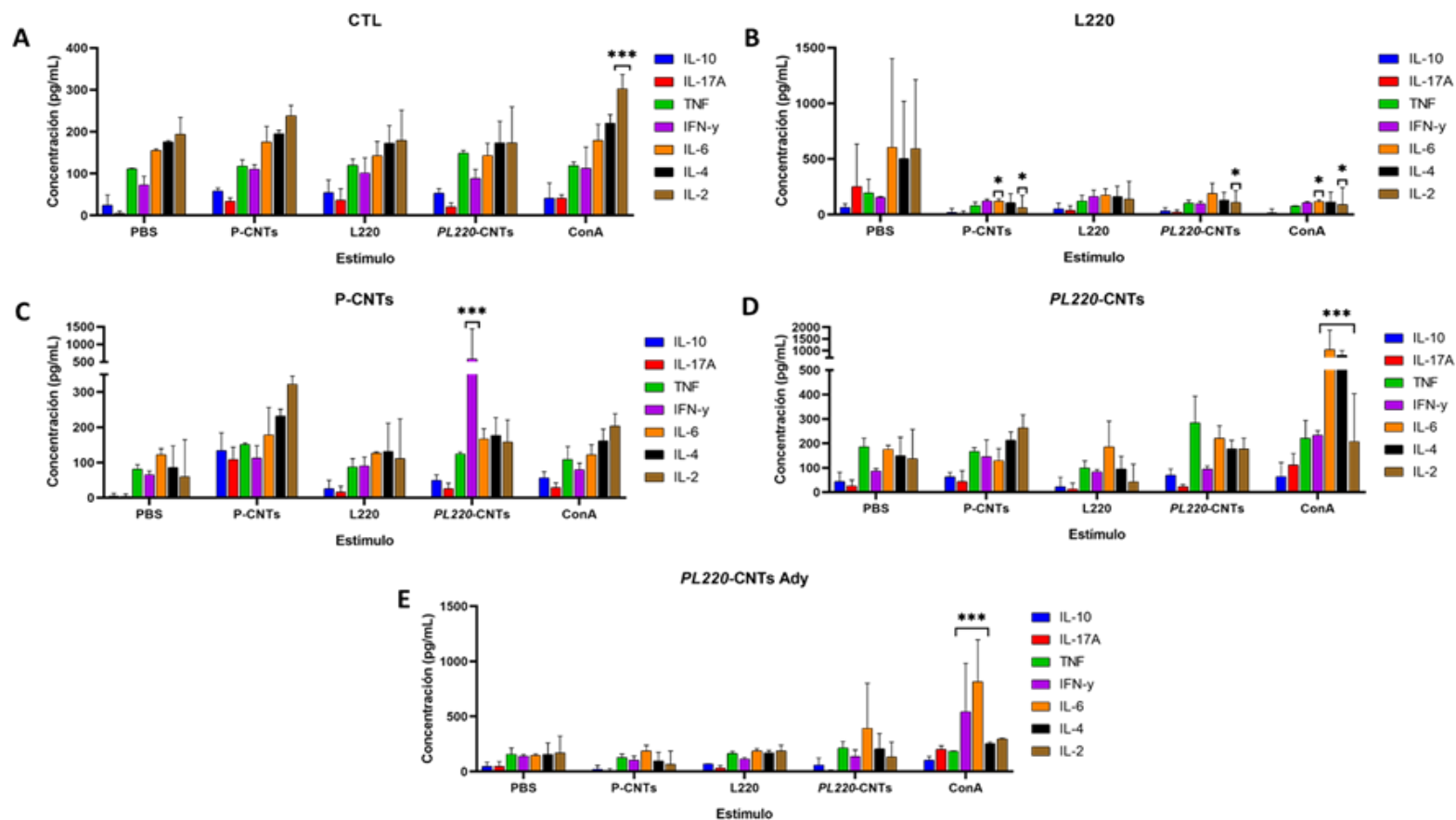


Figura 6. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 48 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratón BALB/c inmunizado. Se muestran los grupos inmunizados con: **A.** PBS; **B.** L220, lectina de 220 kDa (0.5 μ g); **C.** P-CNTs, CNTs purificados (1.25 μ g); **D.** PL220-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 μ g) y **E.** PL220-CNTs Ady. CNTs funcionalizados administrados con adyuvante de Freund. Los cultivos fueron estimulados con los mismos antígenos y ConA, (1 μ g). Las barras muestran la media $\pm$ D.E. de 3 experimentos independientes con 3 réplicas (n=9). * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples (P < 0.05)

Tabla III. Producción de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de los diferentes grupos con diferentes estímulos.

INMUNIZACIÓN	ESTÍMULO	Th1		Th2		Th17		TNF
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17A	IL-6	
CTL	PBS	73.1	194.3	176.6	24.6	5.4	155.8	111.6
	P-CNTs	110.5	238.6	195.4	58.7	33.7	175.9	118.0
	L220	101.4	179.5	172.8	54.4	36.7	142.5*	119.7
	PL220-CNTs	88.6	173.4	173.4	53.5	20.5	143.1	148.7
	ConA	112.6	302.4	220.3	41.5	41.0	179.4	118.4
L220	PBS	154.0	595.0	504.1	65.7	252.9	605.5	194.3
	P-CNTs	123.7	63.2	107.2	19.8	12.0	120.7	79.7
	L220	163.7	141.2	162.8	52.5	37.9	174.6	122.1
	PL220-CNTs	96.6	110.5	129.9	33.1	22.0	190.0	102.8
	ConA	107.2	88.8	113.1	18.4	1.1	117.3	77.6
PL220-CNTs	PBS	87.2	137.7	149.4	43.5	26.2	175.2	185.8
	P-CNTs	144.9	263.9	212.5	63.2	43.4	129.8	167.2
	L220	83.5	42.2	94.9	22.6	13.8	186.2	99.6
	PL220-CNTs	94.6	177.0	177.8	69.9	22.6	221.0	283.7
	ConA	233.2	207.3	796.8*	63.8	111.8	1042.3*	220.6
PL220-CNTs Ady	PBS	140.7	170.1	157.8	46.3	46.8	147.2	157.7
	P-CNTs	105.2	68.5	96.4	21.6	9.9	188.5	127.6
	L220	113.8	186.5	170.6	70.3	32.5	186.5	163.9
	PL220-CNTs	137.2	134.2	207.4	60.7	6.1	392.4	214.6
	ConA	542.6*	297.6	255.6	105.2	201.7	816.6*	184.8
P-CNTs	PBS	65.7	60.2	86.1	4.6	4.2	122.3	81.5
	P-CNTs	112.4	322.2	231.8	134.2	108.6	178.6	151.2
	L220	90.7	111.5	131.8	26.1	16.9	127.3	87.4
	PL220-CNTs	581.1*	158.1	177.1	49.3	26.3	167.2	124.3
	ConA	79.5	203.7	161.8	56.5	29.1	122.2	109.2



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PBS, células sin estímulo; y células estimuladas con: **P-CNTs**, CNTs purificados (1.25 µg); **L220**, lectina de 220 kDa (0.5 µg); **PL220-CNTs**, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 µg) y **ConA**, concanavalina A (1 µg). Cada dato representa la media de 3 experimentos independientes con 3 réplicas (n=9). Concentraciones en pg/mL. *, indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples (P<0.05).

La elevación de la concentración de IL-2 es importante ya que esta citocina es utilizada como factor de crecimiento por los linfocitos T e induce proliferación en todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos (Corpuz *et al.*, 2017). La elevación de esta citocina en las células estimuladas con los *PL220-CNTs*, así como con la *L220* sugiere que las células están reconociendo al antígeno y esta induce la proliferación celular.

Para identificar el tipo de respuesta Th que se produce por los diferentes estímulos se calculó el ratio de IFN- γ /IL-10 para determinar respuesta Th1/Th2 o bien IFN- γ /IL-6 para identificar respuesta Th1/Th17. En la Tabla IV se muestra que el ratio IFN- γ /IL-10 predominante arroja una respuesta Th1, esto indica que los antígenos pudieran estar generando este tipo de respuesta. Sin embargo, el ratón BALB/c induce este tipo de respuesta de manera natural, por esta razón se atribuye que esta respuesta se deba principalmente a esto (Cortes *et al.*, 2019). Por otro lado, al calcular el ratio de IFN- γ /IL-6 se obtuvo un tipo de respuesta predominante Th17, esto ha sido reportado por Guo *et al.* (2009) para la infección por *E. histolytica*. Estos autores demostraron que al inmunizar ratones con una vacuna recombinante de la LecA de *E. histolytica*, se generó una respuesta de tipo Th17 mediada por la liberación de IL-17A por linfocitos T citotóxicos (Guo *et al.*, 2009). Esto demuestra que la respuesta mediada por la liberación de la IL-17A enfoca un tipo de respuesta que confiere protección contra la infección por *E. histolytica*.

Los hallazgos encontrados en el modelo de ratón parecen sustentar el hecho de que la inmunización con *PL220-CNTs* favorece al desarrollo de una respuesta de tipo celular Th1/Th17. Sin embargo, no se puede descartar que el patrón natural

del ratón, que lo hace resistente a la infección con *E. histolytica* no este interfiriendo en este patrón de respuesta.

Tabla IV. Identificación de respuesta Th1, Th2 y Th17 a través del ratio de IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /IL-6 en sobrenadantes a las 48 h.

INMUNIZACIÓN	ESTÍMULO	RADIO			
		IFN- γ /IL-10	Th	IFN- γ /IL-6	Th
CTL	PBS	2.97	1	0.47	17
	P-CNTs	1.88		0.63	
	L220	1.86	1	0.71	17
	PL220-CNTs	1.66		0.62	
	ConA	2.71		0.63	
L220	PBS	2.34	1	0.25	17
	P-CNTs	6.26		1.03	1
	L220	3.12	1	0.94	17
	PL220-CNTs	2.92		0.51	
	ConA	5.82		0.91	
PL220-CNTs	PBS	2.00	1	0.50	17
	P-CNTs	2.29		1.12	1
	L220	3.70	1	0.45	17
	PL220-CNTs	1.35		0.43	
	ConA	3.65		0.22	
PL220-CNTs Ady	PBS	3.04	1	0.96	17
	P-CNTs	4.87		0.56	
	L220	1.62	1	0.61	17
	PL220-CNTs	2.26		0.35	
	ConA	5.16		0.66	
P-CNTs	PBS	14.21	1	0.54	17
	P-CNTs	0.84	2	0.63	17
	L220	3.47	1	0.71	

PL220-CNTs	11.78	3.48	1
ConA	1.41	0.65	17

PBS, células sin estímulo; y células estimuladas con: **P-CNTs**, CNTs purificados (1.25 µg); **L220**, lectina de 220 kDa (0.5 µg); **PL220-CNTs**, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 µg) y **ConA**, concanavalina A (1 µg).

5.1 Análisis histopatológico en pulmón de ratones inmunizados con distintos antígenos.

El análisis histopatológico fue realizado en los pulmones de ratones BALB/c de los grupos inmunizados con: PBS 1X, L220, P-CNTs, *PL220-CNTs*, y *PL220-CNTs* + Ady. El análisis histopatológico se realizó en cortes teñidos con H&E, la revisión de 150 campos por laminilla de los diferentes cortes no reveló alteraciones significativas (Tabla V). Solo uno de los individuos inmunizados con P-CNTs mostró señales de hemorragia en 3 de los campos observados (2% de la muestra analizada). También se encontró congestión vascular (4 de 100 campos observados), esto correspondió al 2.6%, lo cual no fue significativo (Figura 8). Por otro lado, los animales inmunizados con PBS 1X, L220, P-CNTs y *PL220-CNTs* administrados con y sin adyuvante no mostraron daño en el tejido (Figura 7). Estos resultados demuestran que la administración de este tipo de nanopartículas, a la concentración y ruta de administración utilizada, no provocan toxicidad en el organismo a nivel pulmonar (Tabla V).

En comparación, Guzmán-Mendoza *et al.* (2020) inocularon CNT no purificados (UP-CNTs), P-CNTs y funcionalizados con FITC por vía intravenosa en ratones BALB/c a una concentración de 2 mg/kg y se analizó su toxicidad en diferentes órganos a los días 1, 14, 29 y 60 post exposición. Los hallazgos mostraron que los pulmones de los animales expuestos a UP-CNTs a los 60 días postexposición tuvieron un decremento en su tamaño y daño isquémico principalmente en el

pulmón derecho, lesiones posiblemente debidas a la obstrucción ocasionada por las nanopartículas. Por otro lado, los animales expuestos a P-CNTs demostraron tener características normales macroscópicas como el grupo control. En la parte histológica los pulmones de animales expuestos a P-CNTs fueron similares a los del grupo control, con los bronquiolos y alveolos libres de células inflamatorias y sin daño detectable. Cabe destacar que tampoco se encontraron cúmulos de CNTs en el tejido (Guzmán-Mendoza et al., 2020)..

Tabla V. Análisis histopatológico de ratones BALB/c inmunizado con distintos antígenos.

ALTERACIÓN	GRUPO				
	CONTROL NEGATIVO	L220	P-CNTs	PL220-CNTs	PL220-CNTs Ady
Campos positivos (%)					
PRESENCIA DE CNTs	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GRANULOMA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
FIBROSIS	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
HEMORRAGIA	0 (0)	0 (0)	3 (2)	0 (0)	0 (0)
INFLAMACIÓN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CONGESTIÓN VASCULAR	0 (0)	0 (0)	4 (2.6)	0 (0)	0 (0)

CTL (-), ratones sin ningún estímulo; **L220**, estimulados con lectina de 220 kDa (10 µg); **P-CNTs**, estimulados con nanotubos de carbono purificados (15 µg); **PL220-CNTs**, estimulados con nanotubos de carbono funcionalizados (25 µg); **PL220-CNTs + Ady**, estimulados con nanotubos de carbono funcionalizados y administrados con adyuvante de Freund (25 µg). n=150 lecturas/laminilla.

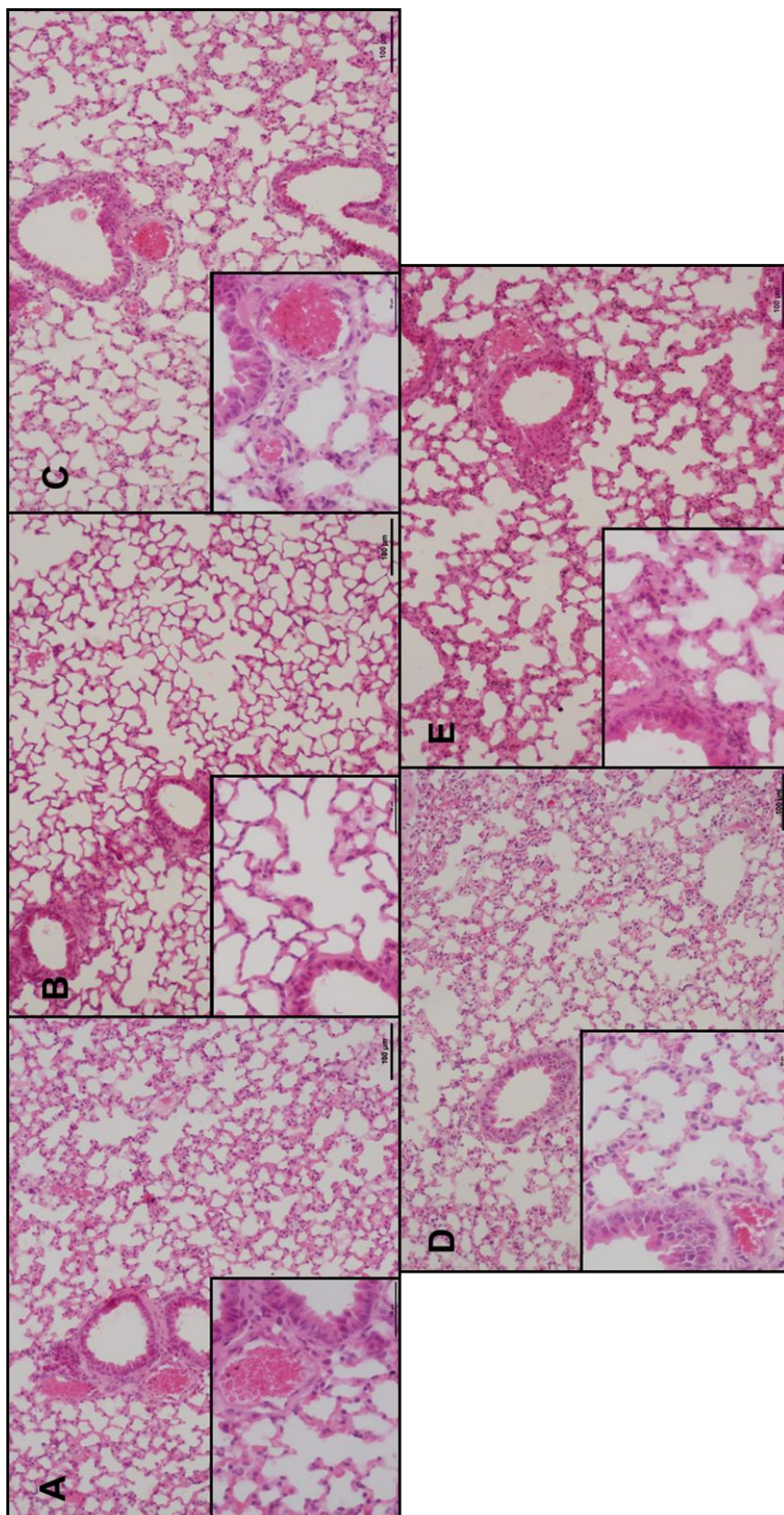


Figura 7. Análisis histopatológico en pulmón de ratón inmunizados con distintos antígenos. Se observa la histología de pulmón de ratones inmunizados con: **(A)** PBS 1x, **(B)** L220, **(C)** P-CNTs, **(D)** PL220-CNTs y **(E)** PL220-CNTs + Ady. Objeto 10X y 40X (inserto). Tinción H&E

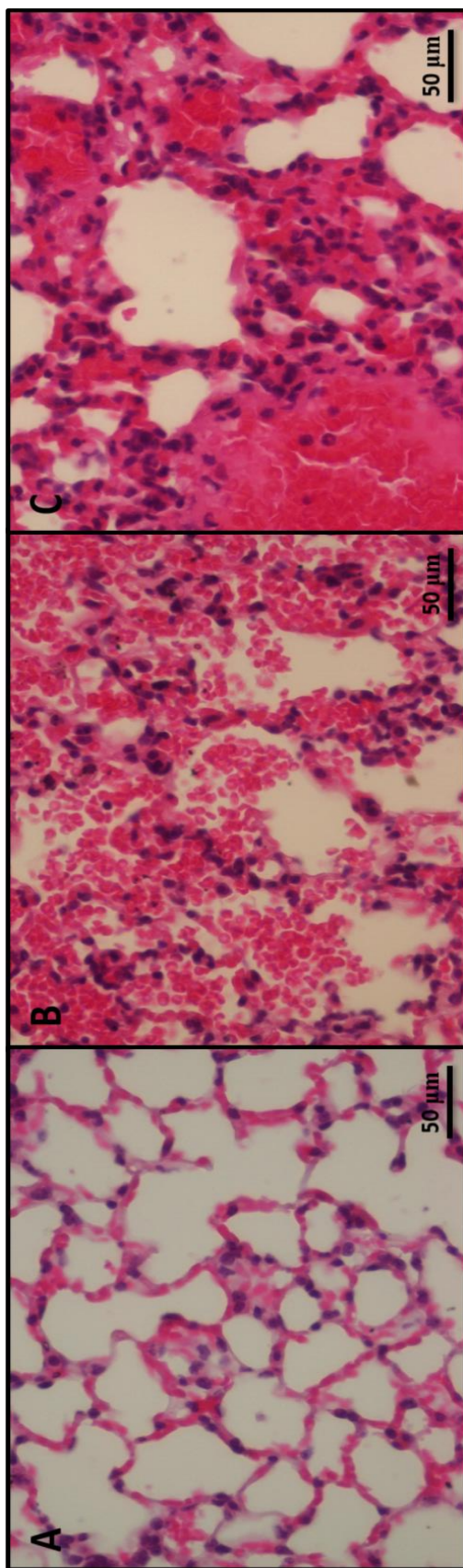


Figura 8. Hallazgo histopatológico en pulmón derecho de ratón inmunizado con P-CNTs. (A) Se observa la arquitectura del tejido pulmonar en estado normal. (B) Hallazgo de hemorragia. (C) Congestión vascular. Objeto original 40X.

5.2 Distribución del espacio alveolar en ratones inmunizados con distintos antígenos.

Una observación que se hizo en algunos pulmones fue una diferencia en el espacio alveolar. Con la finalidad de verificar si esta alteración pudiera ser atribuible a la inmunización, la distribución del espacio alveolar se determinó a partir de la medición de la luz alveolar utilizando el software Image Pro-Plus, los resultados se expresaron en pixeles al cuadrado (PIX²). Los grupos analizados fueron: PBS 1X, L220, P-CNTs, PL220-CNTs y PL220-CNTs + Ady, los resultados mostraron que en los grupos inoculados con PBS 1X (control negativo) y con P-CNTs (control de vehículo) no se encontraron diferencias significativas, lo cual permite concluir que los P-CNTs no inducen una alteración sobre el tejido pulmonar. Por otra parte, los pulmones de los animales inmunizados con L220, PL220-CNTs y PL220-CNTs + Ady, mostraron una disminución significativa de los espacios alveolares respecto al grupo control (Figura 9). Estos resultados podrían deberse al proceso inflamatorio que se genera contra el antígeno administrado, sin embargo, no existen antecedentes de este hecho ni para la L220 ni para los CNTs funcionalizados.

Heinrichs *et al.*, (2009) reportó un caso de alveolitis alérgica en un paciente al ser inmunizado con la vacuna contra la influenza Beggivac®, donde el paciente cursó con inflamación pulmonar. Este tipo de reacciones está asociado al antígeno administrado, en ese caso el virus de la influenza (Heinrichs *et al.*, 2009).

El grupo de Yi *et al.*, (1996) investigaron la alveolitis alérgica extrínseca experimental en ratas inmunizadas con *Corynebacterium parvum* por vía intratraqueal y venosa. Las inoculaciones se realizaron al tiempo cero en la vena dorsal del pene y dos semanas después se aplicó una segunda dosis de 1.5 mg de *C. parvum*; dos semanas después de la última inoculación los animales fueron sacrificados y se evaluó la presencia de inflamación granulomatosa en cortes histológicos de pulmón y se identificó la expresión de mRNA de TNF, IL-6, CC, CXC. Los resultados de la histología arrojaron que los cortes histológicos de pulmón presentaron inflamación perivascular leve con granulomas intraalveolares e íntimos

de frecuencia ocasional. Esto sugiere que el incremento de la actividad inflamatoria en el espacio alveolar está relacionado con mediadores proinflamatorios derivados de macrófagos alveolares gracias a la presencia del antígeno inoculado (Yi et al., 1996). .

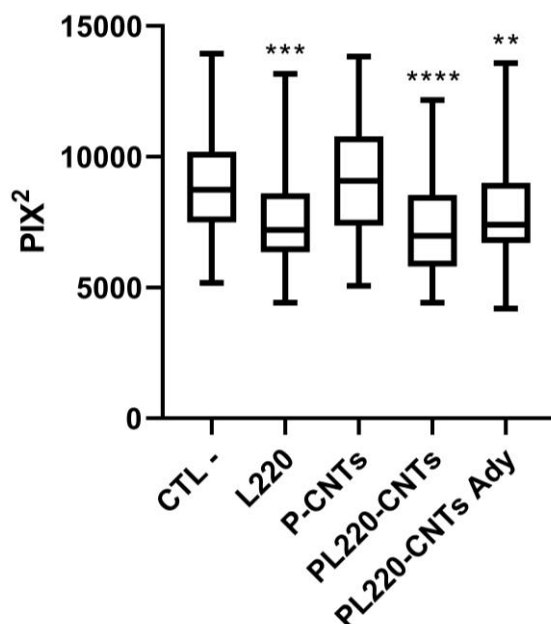


Figura 9. Distribución de espacio alveolar de pulmón de ratón inmunizados con diferentes antígenos. Determinación del espacio alveolar en ratones: **CTL (-)**, ratones inoculados con PBS; **L220**, inmunizados con lectina de 220 kDa (10 µg); **P-CNTs**, inmunizados con nanotubos de carbono purificados (15 µg); **PL220-CNTs**, inmunizados con nanotubos de carbono funcionalizados (25 µg); **PL220-CNTs Ady**, inmunizados con nanotubos de carbono funcionalizados y administrados con adyuvante de Freund (25 µg). Las cajas muestran la mediana de 150 réplicas (n=150). * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Kruskal-Wallis $P < 0.05$.

5.7 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámster estimulados con los diversos antígenos.

Con la finalidad de determinar el tipo de respuesta específica generado en los grupos de hámsteres inmunizados (control, L220 y *PL220*-CNTs), se extrajeron los bazo y se realizó un cultivo primario de esplenocitos de cada uno de ellos. El sobrenadante de los cultivos a las 24 y 48 h se recolectó y se congeló a -80°C para su posterior uso. La determinación del patrón de citocinas de tipo Th1/Th12/Th17 mediante citometría de flujo se determinó cuantificando IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2.

En el grupo control inmunizado con PBS, los resultados en los cultivos de 24 h arrojaron la presencia de bajos niveles de todas las citocinas, a excepción de la IL-10 y la IL-17 que se incrementó significativamente en los esplenocitos estimulados con ConA (Figura 10 A, Tabla VI). En el grupo de animales inmunizados con la L220, se detectaron niveles elevados de IL-10 sin diferencia significativa entre los estímulos (Figura 10 B); estos valores tampoco fueron diferentes con respecto a grupo inmunizado con PBS (Figura 10 A) o con los *PL220*-CNTs (Figura 10 C). Una citocina que sí mostró un aumento significativo en los grupos inmunizados con la L220 o con los *PL220*-CNTs fue la IL-17A (Tabla VI), cuya concentración aumentó en los cultivos estimulados con los *PL220*-CNTs o con ConA (Figuras 10 B y 10 C, Tabla VI). Aunque otras citocinas tuvieron variaciones en sus niveles estas no fueron significativas debido a las desviaciones estándar. El hecho de que en los cultivos de esplenocitos de animales inmunizados con la L220 y estimulados con los *PL220*-CNTs hubiera un incremento significativo de la IL-17A, sugiere que los péptidos presentes en los CNTs funcionalizados fueron reconocidos por células de memoria presentes en el bazo de animales inmunizados solo con la L220 y que el patrón de respuesta del subgrupo Th sea Th17 (Figura 10).

En los cultivos a 48h hubo una disminución en la concentración de las citocinas sin haber una significancia respecto al grupo control (Figura 11). Los datos numéricos



se presentan en la Tabla VIII. En el caso de la IL-17A se observó un incremento significativo en los tres grupos independientemente de la inmunización, detectándose niveles muy elevados cuando los cultivos fueron estimulados con la L220, los PL220-CNTs o con ConA (Figura 11 A, B y C, Tabla VIII). Estos resultados sugieren que la producción de IL-17A podría estar relacionada con la protección observada en la formación del AHA en los hámsteres retados. Esto pudiera sugerir que las células de memoria que se desarrollan gracias a la inmunización con los PL220-CNTs están reconociendo a los trofozoítos de *E. histolytica*, impidiendo que desencadenen una infección en el organismo.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Guo *et al.* (2009) quienes evaluaron la respuesta inmune inducida a través de la vacunación de ratones CBA/J con la LecA, una subunidad recombinante de la Gal/GalNAc. En este estudio ellos demostraron que al inmunizar ratones con este antígeno y realizar cultivos primarios de esplenocitos y de nódulos linfáticos periféricos y estimularlos *in vitro*, el patrón de citocinas secretadas por las células correspondió al subgrupo Th17 mediada por la liberación de IL-17A, en comparación al grupo control sin estímulo (Guo *et al.*, 2009). En otro trabajo realizado por Guo *et al.* (2011) se demostró que los ratones CBA/J vacunados con la LecA inducen una respuesta inmunológica capaz de conferir protección contra la infección. Al evaluar las poblaciones celulares presentes en los animales, demostraron que las células CD4⁺ y CD8⁺ se encontraban en el sistema. Para corroborar su papel en la inmunidad contra la infección, cuantificaron las citocinas que estos secretaban y se demostró que las células CD4⁺ eran positivas a IFN- γ , citocina de un patrón Th1 la cual se reporta es necesaria para combatir la infección. Sin embargo, al cuantificar las citocinas secretadas por las células CD8⁺ se encontraron que la IL-17A fue la citocina predominante. Esto sugirió que la protección dada contra la infección está relacionada con la presencia de esta citocina. Para corroborar este resultado, evaluaron en un co-cultivo de células CD4⁺ y CD8⁺ con *E. histolytica* a fin de observar si tenían un efecto amebicida. El resultado mostró que fueron necesarias 100:1 (CD8⁺: *E. histolytica*) para eliminar un trofozoíto, mientras que se necesitaron

1000:1 de CD4⁺. Esto permite concluir que tanto el IFN- γ de un patrón Th1 ayuda a la eliminación de la amiba, pero que la IL-17A juega un papel importante en la protección contra la infección (Guo et al., 2011b)..

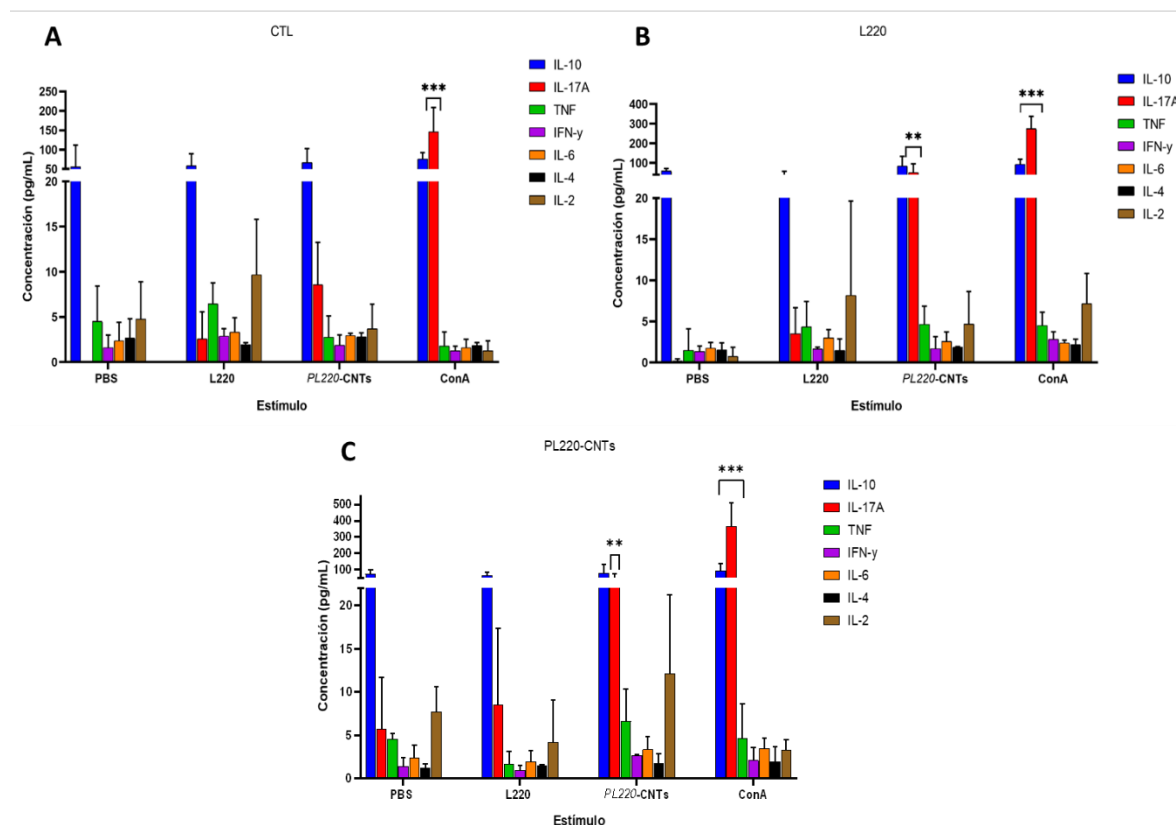


Figura 10. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 24 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámsteres inmunizados con A, PBS; B, L220 y C, PL220-CNTs. PBS, células sin estímulo; y células estimuladas con: L220, lectina de 220 kDa (0.5 μ g); PL220-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 μ g) y ConA, concanavalina A (1 μ g). Cada barra representa la media $\pm$ D.E. de un experimento por triplicado (n=18). *, indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples (P<0.05).

Tabla VI. Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivos estimulados con diversos antígenos a las 24 horas.

INMUNIZACIÓN	ESTÍMULO	24 h						
		Th1		Th2		Th17		
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17A	IL-6	TNF
CTL	PBS	1.6	4.8	2.7	55.6	0.0	2.4	4.5
	L220	2.9	9.7	1.9	58.8	2.5	3.3	6.5
	PL220-CNTs	1.9	3.7	2.8	66.5	8.5	2.9	2.8
	ConA	1.3	1.2	1.8	75.8	145.6*	1.6	1.8
L220	PBS	1.4	0.8	1.6	58.8	0.2	1.8	1.5
	L220	1.7	8.2	1.5	38.2	3.5	3.0	4.3
	PL220-CNTs	1.7	4.7	1.9	84.1	50.9*	2.6	4.6
	ConA	2.8	7.2	2.2	92.5	273.9*	2.4	4.5
PL220-CNTs	PBS	1.4	7.7	1.2	73.2	5.7	2.4	4.5
	L220	0.9	4.2	1.5	64.9	8.5	1.9	1.6
	PL220-CNTs	2.6	12.1	1.7	78.6	40.6*	3.3	6.6
	ConA	2.1	3.3	1.9	92.3	366.2*	3.5	4.6

CTL, hámsteres inoculados con PBS 1X como control negativo; L220, estimulados con lectina de 220 kDa (10 μ g); PL220-CNTs, estimulados con nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g CNTs: 10 μ g Ag). Cada dato representa la media de 6 experimentos independientes con 3 réplicas (n=18). Concentraciones en pg/mL. * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Dunnett ($p < 0.05$).

Con la finalidad de verificar si los patrones de citocinas correspondían a un subgrupo en particular, se calcularon los radios Th1/Th2/Th1. En la Tabla VII se puede observar que el radio IFN- γ /IL-10 fue en todos los casos menor a 1, por lo cual la respuesta se enfoca hacía una respuesta tipo Th2; esto estuvo influenciado principalmente porque las concentraciones de IL-10 siempre estuvieron por arriba

de las de IFN- γ . Sin embargo, la respuesta inmune en los hámsteres por naturaleza esta mediada por la liberación de esta citocina, lo que los hace susceptibles a la infección por *E. histolytica* por lo que son utilizados como modelo para inducción de la infección.

Así mismo, se observó que cuando los animales fueron inmunizados y los esplenocitos son estimulados *in vitro* con los diferentes antígenos la respuesta evocó más una respuesta tipo Th17, especialmente en aquellos animales inmunizados con los PL220-CNTs. Estos resultados sugieren que la respuesta que se genera por estos antígenos es de tipo Th17, con aumento en la liberación de la IL17A.

Tabla VII. Identificación de respuesta Th1, Th2 y Th17 a través del ratio de IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /IL-17A en sobrenadantes a las 24 h.

INMUNIZACIÓN	ESTÍMULO	RADIO			
		IFN- γ /IL-10		IFN- γ /IL-17A	
			Th		Th
CTL	PBS	0.029	2	PBS	0.000
	L220	0.049		L220	1.150
	PL220-CNTs	0.028	2	PL220-CNTs	0.219
	ConA	0.017		ConA	0.009
L220	PBS	0.023	2	PBS	5.906
	L220	0.043		L220	0.470
	PL220-CNTs	0.020	2	PL220-CNTs	0.033
	ConA	0.031		ConA	0.010
PL220-CNTs	PBS	0.019	2	PBS	0.246
	L220	0.014		L220	0.106
	PL220-CNTs	0.033	2	PL220-CNTs	0.064
	ConA	0.022		ConA	0.006

CTL, hámsteres inoculados con PBS 1x como control negativo; L220, estimulados con lectina de 220 kDa (10 μ g); PL220-CNTs, estimulados con nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g CNTs:

10 μg Ag). Cada dato representa la media del radio de un experimento por triplicado ($n=18$). * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Dunnett ($p < 0.05$).

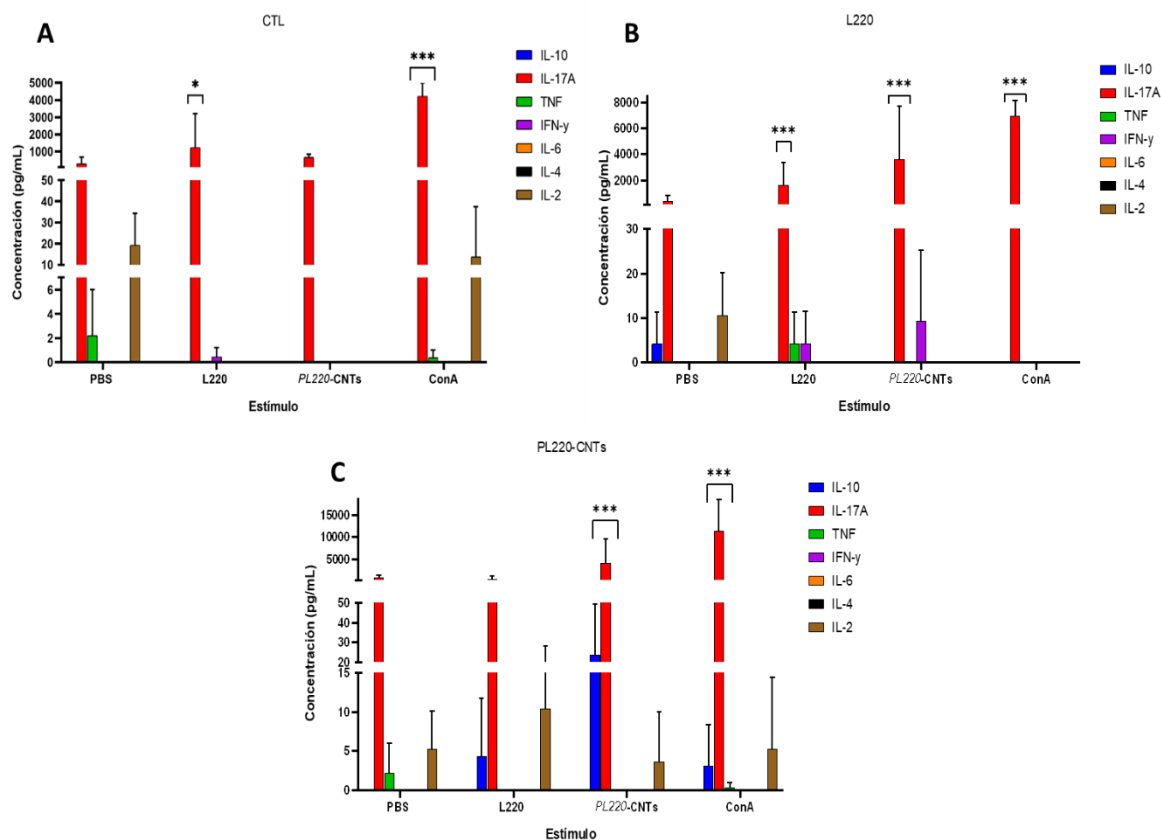


Figura 11. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 a las 48 h en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de hámsteres inmunizados con A, PBS; B, L220 y C, PL220-CNTs. PBS, células sin estímulo; y células estimuladas con: L220, lectina de 220 kDa (0.5 μg); PL220-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 μg) y ConA, concanavalina A (1 μg). Cada barra representa la media $\pm$ D.E. de un experimento por triplicado ($n=18$). *, indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples ($P < 0.05$).

Tabla VIII. Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de cultivos estimulados con diversos antígenos a las 48 horas.

INMUNIZACIÓN	ESTÍMULO	48 h						
		Th1		Th2		Th17		
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17A	IL-6	TNF
CTL	PBS	0.0	19.3	0.0	0.0	287.2	0.0	2.2
	L220	0.4	0.0	0.0	0.0	1225.0*	0.0	0.0
	PL220-CNTs	0.0	0.0	0.0	0.0	655.5	0.0	0.0
	ConA	0.0	13.7	0.0	0.0	4220.7*	0.0	0.4
L220	PBS	0.0	10.6	0.0	0.0	363.4	0.0	0.0
	L220	4.3	0.0	0.0	0.0	1637.7*	0.0	0.0
	PL220-CNTs	9.2	0.0	0.0	0.0	3605.5*	0.0	4.2
	ConA	0.0	0.0	0.0	0.0	6982.9*	0.0	0.0
PL220-CNTs	PBS	0.0	5.3	0.0	0.0	950.2	0.0	0.0
	L220	0.0	10.4	0.0	4.3	606.3	0.0	0.0
	PL220-CNTs	0.0	3.7	0.0	23.7	4240.4*	0.0	0.0
	ConA	0.0	5.3	0.0	3.1	11296.2*	0.0	0.0

CTL, hámsteres inoculados con PBS 1x como control negativo; L220, estimulados con lectina de 220 kDa (10 μ g); PL220-CNTs, estimulados con nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g CNTs: 10 μ g Ag). Cada dato representa la media de un experimento independiente con 3 réplicas (n=18). Concentraciones en pg/mL. * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Dunnett ($p < 0.05$).

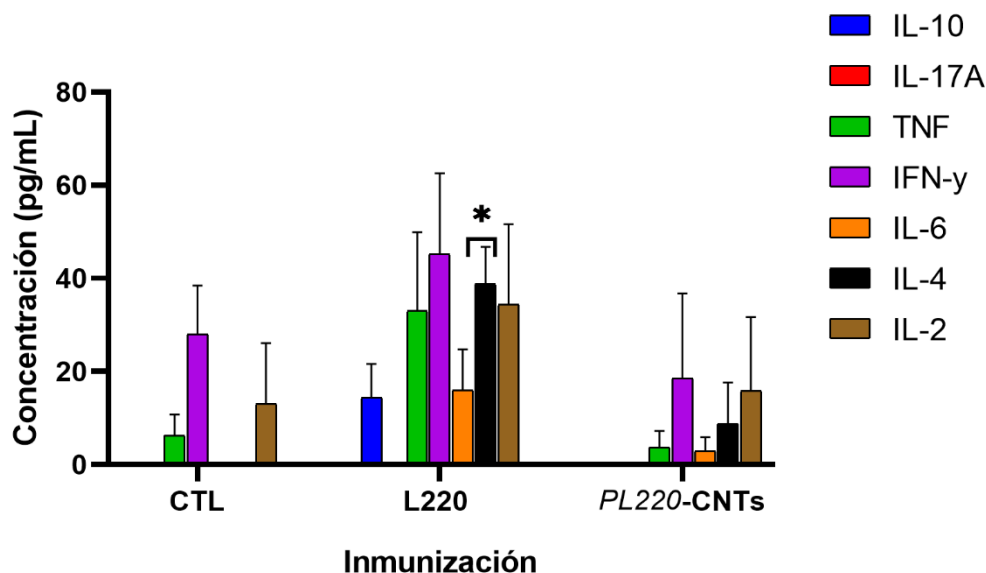


Figura 12. Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 en los sueros de los hámsteres de los diferentes grupos. CTL, animales inoculados con PBS 1X (40 μ L); L220, lectina de 220 kDa (10 μ g) y **PL220-CNTs**, nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g). Las barras muestran la media $\pm$ D.E. de un experimento independiente por triplicado (n=18). * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples ($P < 0.05$).

Finalmente, se determinaron los niveles de citocinas en el suero de los hámsteres inmunizados con los diversos antígenos (Figura 12). En los animales del grupo control inmunizado con PBS solo se pudieron cuantificar el TNF, el IFN- γ y la IL-2 en bajos niveles. En los animales inmunizados con la L220 se observó un incremento significativo en los niveles de IL-4 respecto al grupo control (inmunizado con PBS), logrando detectar además la IL-10 y la IL-6 con bajos niveles. El incremento en la producción de IL-4 concuerda con lo reportado por Talamás-Rohana *et al.* (1995), quienes observaron que los ratones que son inmunizados con la L220 producen mayormente IL-4 lo cual enfoca la respuesta hacia un tipo Th2 (Talamas-Rohana *et al.*, 1995a). Por otro lado, se observó que cuando los animales son inmunizados con los PL220-CNTs no se incrementaron los niveles de IL-4 y las citocinas que se encontraron en mayor concentración fueron la IL-2 y el IFN- γ , lo



cual sugiere que la inmunización con los *PL220*-CNTs promueve una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, es importante destacar que los tiempos de toma de muestra de suero pueden variar los resultados, por lo cual el inducir la respuesta en un modelo *in vitro* permite controlar el tipo de respuesta que se genera.

5.3 Inmunodetección de anticuerpos α -L220 en hámsteres inmunizados con los diferentes antígenos.

Se utilizaron dos grupos independientes de hámsteres, el primer grupo correspondió a animales inmunizados con los antígenos (PBS, L220 y *PL220*-CNTs) y el segundo grupo fueron animales igualmente inmunizados y retados con trofozoítos de *E. histolytica* vía intrahepática (animales donde se evaluó el AHA), la inmunodetección se realizó post infección. Cada grupo se conformó por 3 grupos de hámsteres (n=6 animales), se identificaron los títulos de anticuerpos anti-L220 en los sueros de los animales inoculados mediante la técnica de western blot a diluciones de 1:50, 1:500 y 1:1000.

La inmunodetección en los sueros de los animales del grupo control negativo no mostró títulos de anticuerpos contra la L220, lo que corroboró la seguridad e inocuidad de los animales para proseguir con la experimentación (Figura 13 y 14). El suero preinmune tampoco mostró señal positiva; como control positivo se utilizó un antisuero policlonal anti-L220 de fabricación doméstica (Anexo 7.3).

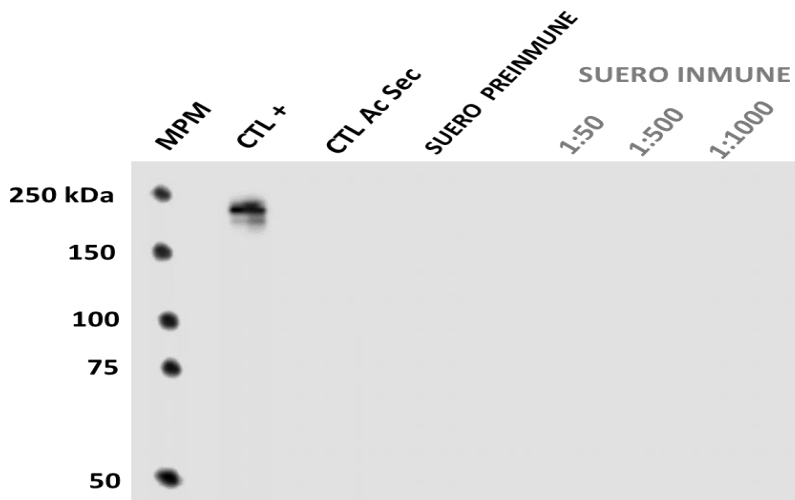


Figura 13. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámster control inmunizados con PBS 1X. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control del anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, suero obtenido antes de la inmunización. SUERO INMUNE, inmunodetección a diferentes diluciones (1:50 – 1000) después de la inmunización.

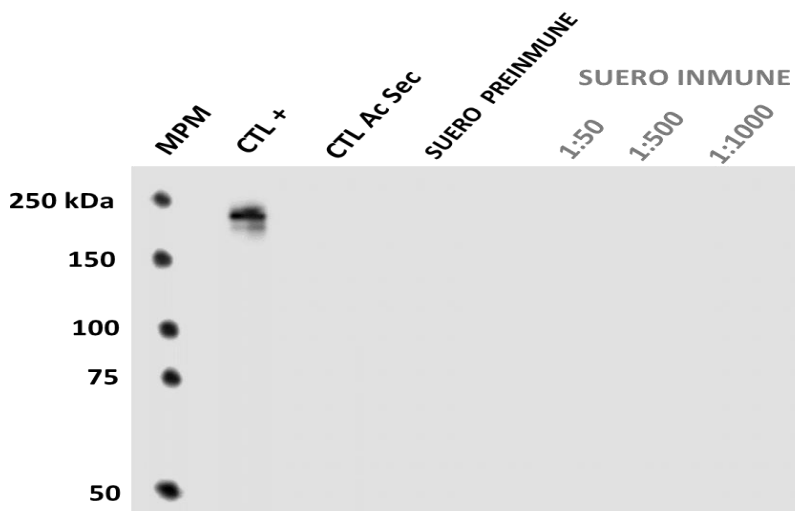


Figura 14. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con PBS 1X y retado con trofozoítos de *E. histolytica*. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, suero obtenido antes de la inmunización. SUERO INMUNE, Inmunodetección a diferentes títulos (1:50 – 1000) después de la inmunización.

En el grupo de animales inmunizados con la L220, el suero preinmune no presentó títulos de anticuerpos anti-L220, mientras que el suero postinmune mostró señal positiva a títulos de 1:50, 500 y 1000 (Figura 15). Resultados similares fueron reportados por Rosales-Encina *et al.*, (1985).

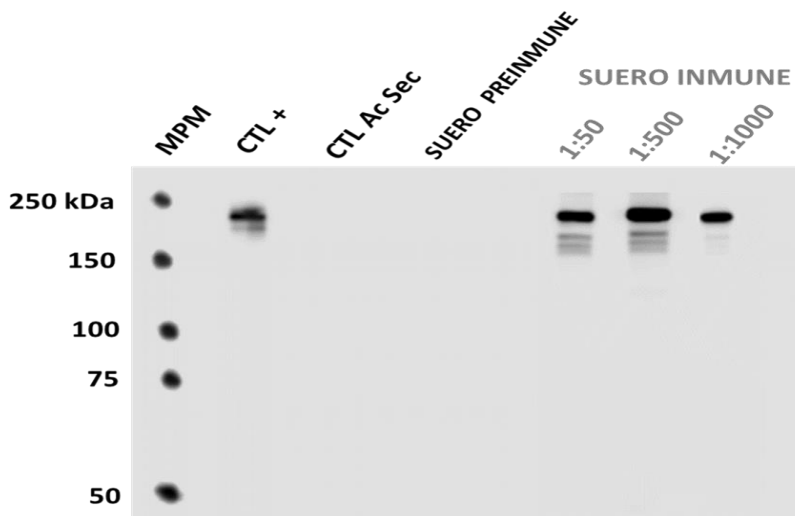


Figura 15. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámster inmunizados con la L220. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, suero obtenido antes de la inmunización. SUERO INMUNE, Inmunodetección a diferentes títulos (1:50 – 1000) después de la inmunización.

En el caso del grupo inmunizado con la L220 y retado con trofozoítos de *E. histolytica*, el suero preinmune fue negativo y postinfección mostró señal positiva a títulos 1:50 en todos los animales. Por otro lado, solo un animal tuvo títulos 1:1000 (Figura 16).

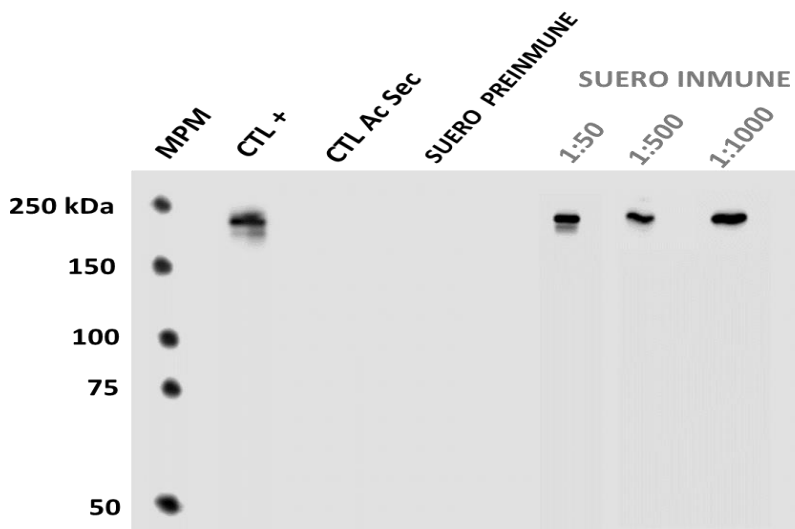


Figura 16. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inoculados con la L220 y retado con trofozoítos de *E. histolytica*. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, suero obtenido antes de la inmunización. SUERO INMUNE, Inmunodetección a diferentes títulos (1:50 – 1000) después de la inmunización

En los sueros de los animales inmunizados con los PL220-CNTs, los sueros preinmunes no presentaron anticuerpos anti-L220 (Figura 17). Después de la inmunización tampoco se encontraron títulos de anticuerpos anti-L220 en ninguno de los animales de este grupo (Figura 17). El resultado fue similar en los animales inmunizados y retados con trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 18). Esto permite concluir que los animales inmunizados con los PL220-CNTs desarrollaron una baja respuesta de tipo humoral, lo que podría dejar abierta la posibilidad de que esta inmunización podría estar desencadenando principalmente una respuesta de tipo celular. Una respuesta de tipo Th1 produce citocinas como el IFN- γ que regula negativamente la señal de la IL-4, esto inhibe la respuesta mediada por células Th2 lo cual podría explicar la baja producción de anticuerpos (Zhu & Paul, 2008).

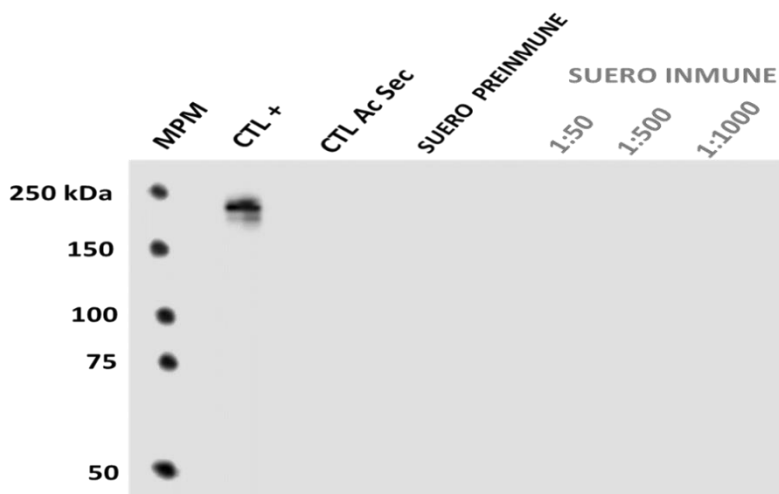


Figura 17. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con *PL220-CNTs*. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, inmunodetección antes de la inmunización; SUERO INMUNE, Inmunodetección a diferentes títulos (1:1000 – 50) después de la inmunización.

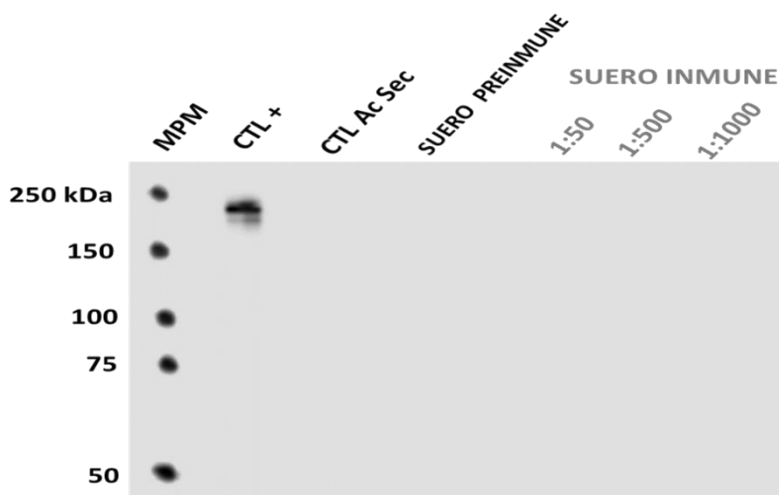


Figura 18. Detección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en hámsteres inmunizados con *PL220-CNTs* y retado con trofozoítos de *E. histolytica*. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; SUERO PREINMUNE, inmunodetección antes de la inmunización; SUERO INMUNE, Inmunodetección a diferentes títulos (1:1000 – 50) después de la inmunización.

Cabe destacar que los *PL220*-CNTs están funcionalizados con péptidos de la L220 y un trabajo realizado por Guzmán-Mendoza *et al.* (2018) demostró, al correr un SDS-PAGE, que estos *PL220*-CNTs están funcionalizados con péptidos de 80 kDa. Esto es comparable a lo descrito por Talamás-Rohana *et al.* (1995), donde ellos demostraron que péptidos de 80 kDa de la L220 desencadenan un tipo de respuesta mayormente de tipo Th1 mediado por IFN- γ e IL-2. Esto explicaría la baja respuesta humoral presente en los animales inmunizados con los *PL220*-CNTs.

El resumen de los títulos de anticuerpos anti-L220 para los diferentes grupos y experimentos se muestra en las Tablas IX y X.

Tabla IX. Títulos de anticuerpos α -L220 obtenidos en los diferentes grupos.

GRUPOS	TÍTULOS		
	1:50	1:500	1:1000
CTL (-)	0/6	0/6	0/6
L220 + Ady*	6/6	4/6	3/6
PL220-CNTs	0/6	0/6	0/6

CTL (-), ratones inmunizados con: PBS 1X, como control negativo; *PL220*-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g CNTs:10 μ g Ag); L220 + Ady, lectina de 220 kDa (10 μ g). Detección realizada por quimioluminiscencia a concentración de picogramos (1:50 – 1:1000) y femtogramos (1:10). *Adyuvante completo e incompleto de Freund's.

Tabla X. Títulos de anticuerpos α -L220 obtenidos en los diferentes grupos retados con trofozoítos de *E. histolytica*.

GRUPOS	TÍTULOS		
	1:50	1:500	1:1000
CTL (-)	0/6	0/6	0/6
L220 + Ady*	6/6	1/6	1/6
PL220-CNTs	0/6	0/6	0/6

CTL (-), ratones inmunizados con: PBS 1x, como control negativo; *PL220*-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (25 μ g CNTs:10 μ g Ag); L220 + Ady, lectina de 220 kDa (10 μ g). Detección realizada por quimioluminiscencia a concentración de picogramos (1:50 – 1:1000) y femtogramos (1:10). *Adyuvante completo e incompleto de Freund's.

5.4 Ensayos de proliferación celular en cultivos primarios de esplenocitos de hámsteres estimulados con los distintos antígenos.

Los ensayos de proliferación celular se realizaron a partir del bazo de los hámsteres de los distintos grupos inmunizados con los diversos antígenos (PBS 1x, L220 y PL220-CNTs). Como control positivo a proliferación se utilizó ConA. Los cultivos se trataron individualmente y se estimularon con los diversos antígenos, a fin de determinar si las células reaccionaban frente al antígeno en cultivo y determinar así la proliferación celular de cada uno de los grupos expuestos.

Para realizar el cálculo del porcentaje de proliferación celular, la proliferación del grupo de células sin estímulo se consideró como el 100%. Los grupos que fueron estimulados con los diversos antígenos se compararon contra el grupo control negativo mediante comparación de medias con el método de Dunnette.

En la Figura 19 se presenta la respuesta de proliferación de los esplenocitos del grupo control. Como se puede observar, las células no mostraron diferencia significativa en su proliferación con respecto al control sin estímulo, lo cual permite deducir que no hubo un reconocimiento de los antígenos por parte de las células en cultivo. Esto confirma que estos animales no estuvieron en contacto con el antígeno previamente. Solo con el estímulo con ConA mostró un aumento significativo en la proliferación con respecto al control. La ConA es una lectina que actúa como mitógeno inespecífico de diferentes subgrupos de linfocitos T (Kirchner & Blaese, 1973).

El ensayo de proliferación en el grupo de hámsteres inmunizados con la L220 mostró un patrón similar, en donde solo las células estimuladas con ConA aumentaron su proliferación. En este grupo podría esperarse que las células provenientes de animales inmunizados con la L220, al ser estimuladas en cultivo con el mismo antígeno respondieran frente al estímulo ya que se encontrarían por segunda vez con el mismo. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 19, no fue así. La L220 es un potente estimulador de la respuesta inmune humoral y



buen estimulador en la producción de anticuerpos (Talamas-Rohana *et al.*, 1995b). Sin embargo, se ha demostrado que la L220 no actúa como un mitógeno celular, ya que en cultivo los linfocitos no proliferan al ser estimulados con esta proteína (Rosales-Encina *et al.*, 1987). Por otro lado, las células retadas con los PL220-CNTs no mostraron un aumento en la proliferación probablemente como parte de los efectos de la L220.

En el caso de los animales inmunizados con PL220-CNTs, los esplenocitos estimulados *in vitro* con los diversos antígenos mostraron un patrón de proliferación diferente (Figura 19), con un incremento significativo al ser retadas con la L220 o con los PL220-CNTs. Esto sugiere que los animales generaron clonas o posibles células de memoria contra los péptidos presentes en el nanotubo de carbono y que estas fueron capaces de reconocer en cultivo a la L220. Aunque no se han hecho estudios, en los PL220-CNTs se encuentren epítomos de la L220 que estén expuestos y puedan ser reconocidos por las células. Esto fue reportado por Versiani *et al.* (2017), ellos inmunizaron ratones BALB/c con CNTs funcionalizados con proteínas de envoltura del virus del Dengue (MWNT-DENV3E) a fin de demostrar si se inducía una respuesta inmunológica contra el virus. Sus resultados mostraron que los esplenocitos de animales inmunizados con los MWNT-DENV3E en cultivos tuvieron una mayor proliferación comparada con el grupo control sin estímulo. Esto demostró que los CNTs funcionalizados con una proteína inducen una respuesta inmunológica contra el antígeno y que además la respuesta juega un papel en la evasión de la infección (Versiani *et al.*, 2017).

La respuesta inmune contra la L220 y los PL220-CNTs indujo un tipo de respuesta en las células en cultivo, el cual es denominado expansión clonal. En este proceso se desata una activación y proliferación celular en respuesta al reconocimiento del antígeno (Samaniego-Soto, 2016). En las Figuras 20 y 21 se muestra el aspecto de los cultivos de esplenocitos a las 24 y 48 h. Como se puede observar, hay la formación de cúmulos de células al ser retadas con ConA, L220 y PL220-CNTs, estos cúmulos muestran la respuesta que tienen las células al reconocer a su

antígeno específico en el cultivo y como proliferan ante él. Los cultivos estimulados con la L220 y *PL220*-CNTs fueron los que tuvieron mayor número de focos de proliferación, estos últimos rodean un cumulo de color negro correspondientes a *PL220*-CNTs, aquí es donde se puede estar presentando el reconocimiento del antígeno.

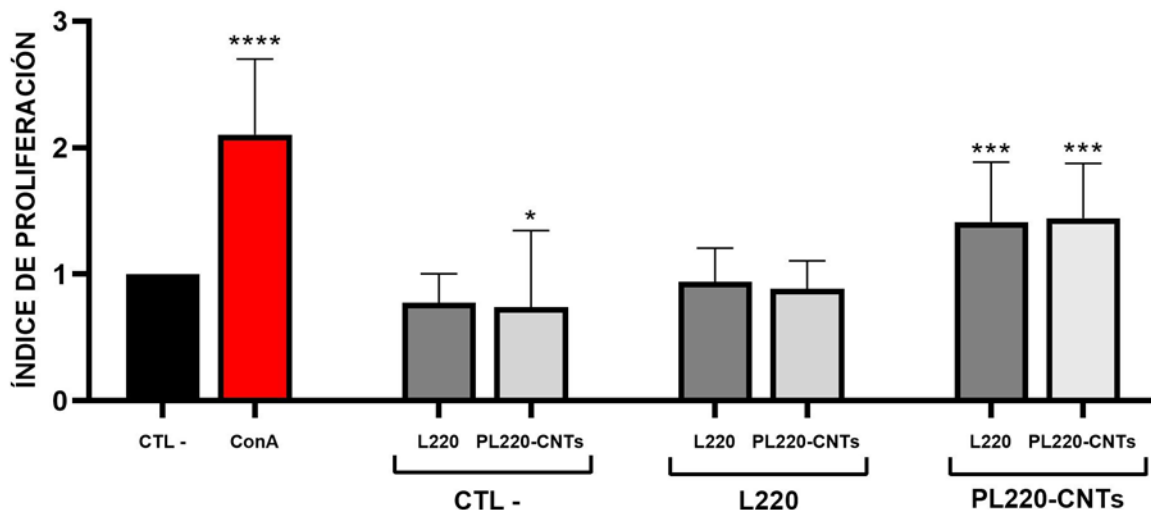


Figura 19. Proliferación celular de esplenocitos de hámster inmunizados y estimulados con los diferentes antígenos en cultivo. CTL -, células sin estímulo; ConA, concanavalina A (1 µg); L220, lectina de 220 kDa (0.5 µg); *PL220*-CNTs, nanotubos de carbono funcionalizados (1.25 µg). El gráfico muestra un experimento con 6 réplicas biológicas por triplicado (n=18). Las barras muestran la media ± D.E. de 6 experimentos independientes con 3 réplicas (n=18). * Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Dunnett (p < 0.05).

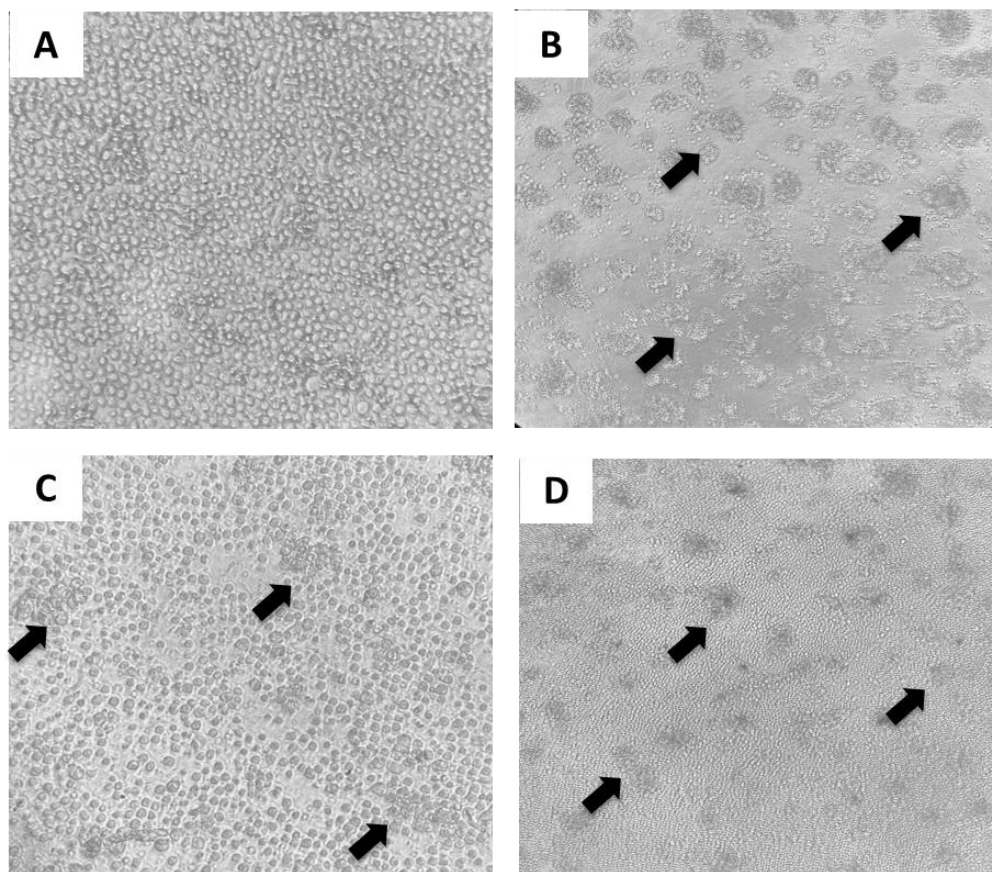


Figura 20. Aspecto de la proliferación celular en esplenocitos de hámster inmunizado con PL220-CNTs y expuestos a los diferentes antígenos a las 24 h de cultivo. A, células sin estímulo; B, ConA (1 µg); C, L220 (0.5 µg); D, PL220-CNTs (1.25 µg). Las flechas señalan los focos de proliferación. Aumento original 10x.

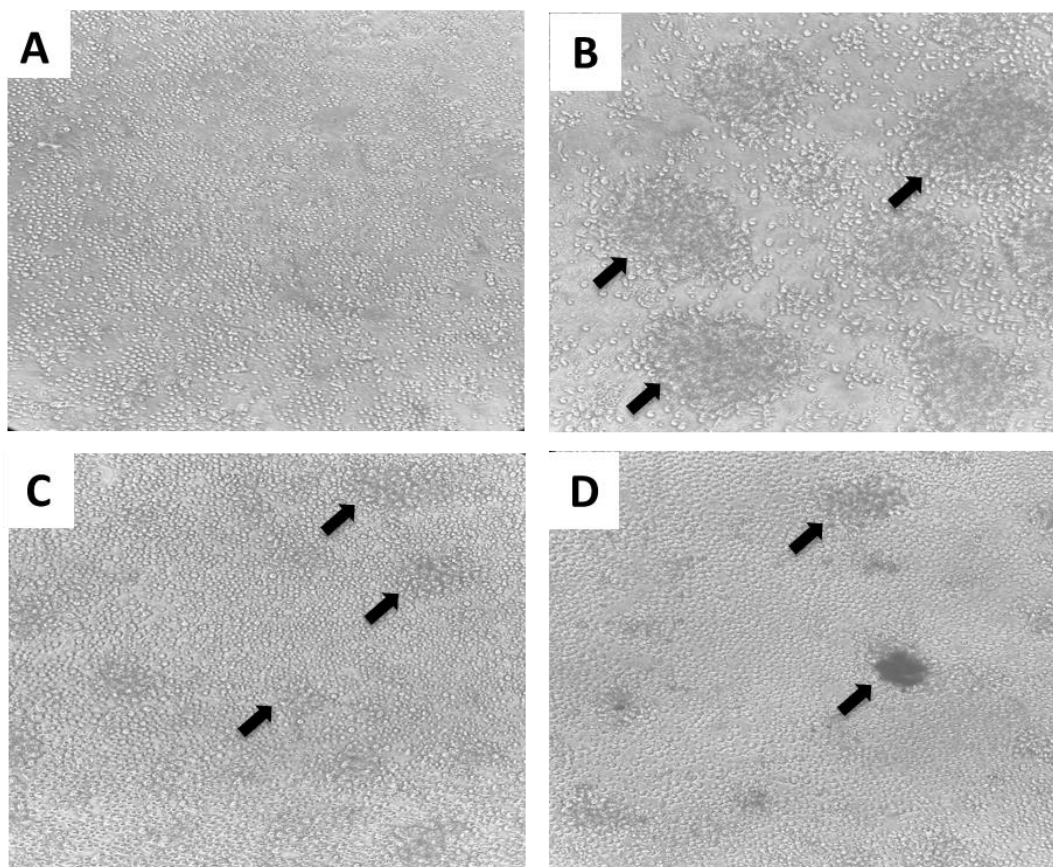


Figura 21. Aspecto de la proliferación celular en esplenocitos de hámster inmunizado con PL220-CNTs y expuestos a los diferentes antígenos a las 48 h de cultivo. A, células sin estímulo; B, ConA (1 µg); C, L220 (0.5 µg); D, PL220-CNTs (1.25 µg). Las flechas señalan los focos de proliferación. Aumento original 10x.

Estos resultados demuestran que los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con los PL220-CNTs tuvieron una respuesta mayor respecto a los demás grupos. Esto sugiere que probablemente los PL220-CNTs estén promoviendo un tipo de respuesta celular, ya que al estimular la proliferación celular en cultivo los linfocitos T podrían estar reconociendo epítomos presentes en la L220, mismos que fueron reconocidos *in vivo* en los PL220-CNTs.

Adicionalmente, esto concuerda con el hecho de que este grupo fue el que presentó nula respuesta en los títulos de anticuerpos anti-L220.

5.5 Eficacia de protección contra la formación de absceso hepático amebiano en hámsteres retados con trofozoítos de *E. histolytica*.

Después del protocolo de inmunización de los hámsteres se realizó el reto con *E. histolytica* por vía intrahepática a fin de evaluar la formación del AHA. En la Figura 22 se pueden observar los hígados (H1 al H6) de los animales de los diferentes grupos: control, L220 y PL220-CNTs. En el grupo control el 66.6% de animales infectados desarrollaron AHA (Tabla XI), en tanto que en el grupo inmunizado con L220 únicamente el 16.6% de animales infectados presentó AHA. Por último, ninguno de los animales inmunizados con PL220-CNTs desarrolló AHA. Con esto se encontró que el porcentaje de protección para la formación de AHA fue mayor para los inmunizados con los PL220-CNTs, seguido de los inmunizados con la L220 (Tabla XI). Estos resultados sugieren que los PL220-CNTs fueron capaces de generar una respuesta inmune adecuada y eficiente para proteger a los animales contra la infección.

Estos resultados son comparables a lo reportado por Martínez *et al.* (2009), quienes desarrollaron una vacuna de ADN (pcDNA-Ehcpadh) contra *E. histolytica* evaluando la protección con el modelo de formación del AHA en hámster. En ese caso el protocolo de inmunización se llevó a cabo por vía intramuscular e intradérmica a los días 0 y 20, utilizando 200 µg de *cDNA-Ehcp112/pcDNA-Ehadh112* (100/100µg). El reto se realizó por vía intrahepática con 250,000 trofozoítos virulentos de *E. histolytica* HM1: IMSS, 20 días después los animales se sacrificaron y se extrajo el hígado para su análisis. La formación de AHA del grupo de animales inmunizados por vía intradérmica arrojó que casi un 80% del grupo control desarrollo AHA, mientras que aquellos inmunizados solo con el plásmido pcDNA3 que se utilizó como vector presentaron un desarrollo de AHA de casi 70%. El grupo inmunizado con la vacuna presentó un desarrollo del AHA de aproximadamente 10%, este resultado demostró que la inmunización desarrolla una respuesta de protección contra la infección. Esto es contrastante al grupo inmunizado por vía intramuscular donde los porcentajes fueron de 80% del grupo control, 60% del grupo inmunizado

con el vector y de 50% del vacunado. Esto demuestra que la vía de inmunización es importante para poder desarrollar una respuesta inmunológica eficaz contra la infección (Martínez *et al.*, 2009b). El reto se realizó con 1×10^6 trofozoítos y el tiempo de formación del AHA fue de 7 días, con lo cual se esperaría que el tamaño del absceso fuese mayor. Sin embargo, una limitación de los resultados fue que el tamaño del AHA no superó al 10% del peso del hígado (Tabla XI).

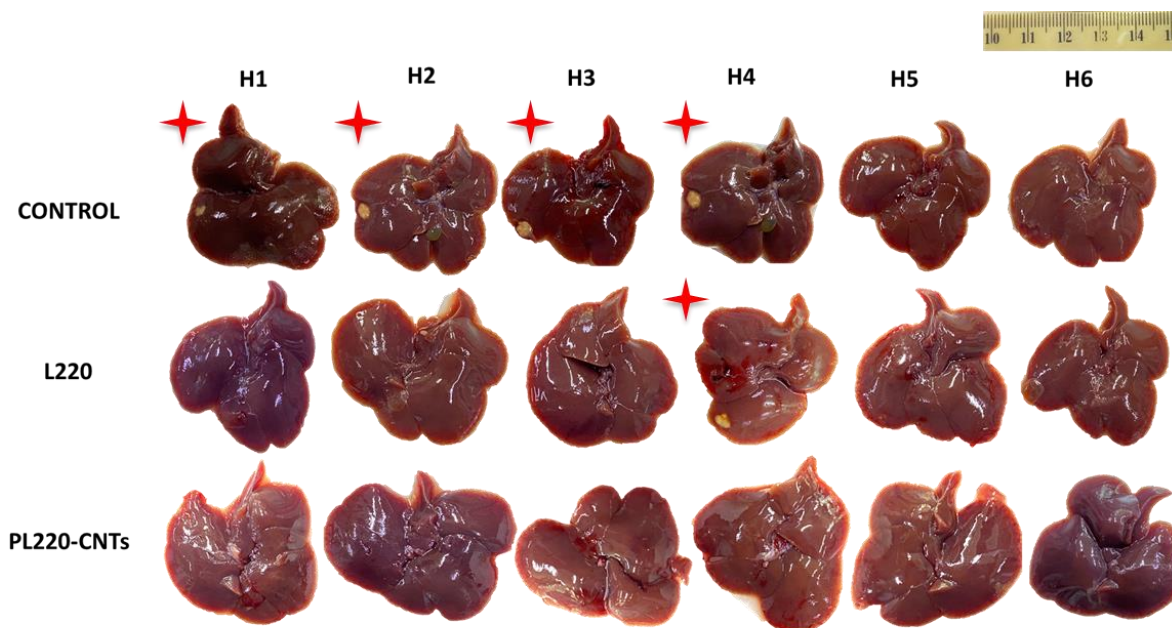


Figura 22. Formación de AHA en hámsteres inmunizados y retados por vía intrahepática con trofozoítos de *E. histolytica*. CONTROL, animales inmunizados con PBS; **L220**, animales inmunizados con L220 (10 μ g); **PL220-CNTs**, animales inmunizados con PL220-CNTs (25 μ g).

Tabla XI. Desarrollo de AHA en hámsteres inmunizados y no inmunizados después del reto intrahepático con *E. histolytica*.

GRUPO*	PRESENCIA AHA	AHA (%)	EFICACIA DE PROTECCIÓN (%) **	DAÑO (%) MEDIA ± D.E.
CONTROL	4/6	66.6	0	1.142 ± 1.025
L220	1/6	16.6	75.08 ^a	0.244 ± 0.598
PL220-CNTs	0/6	0	100.00 ^b	0.0 ± 0.0

* Inmunización subcutánea, ** Calculado como $100 \times [1 - (\% \text{ animal inmunizado con absceso hepático} / \% \text{ animales de grupo control con absceso hepático})]$. a y b Indica diferencia significativa con respecto al control mediante el método de Fisher ($p < 0.05$).



VI. CONCLUSIONES.

Los esplenocitos de ratones BALB/c secretaron un patrón de citocinas dependiente del antígeno y del estímulo. Se observó una respuesta tipo Th1 en todos los grupos con una mayor producción de IFN- γ que de IL-10. Sin embargo, en el grupo inmunizado con PL220-CNTs los valores de IL-6 fueron más elevados sugiriendo que la respuesta inducida por los PL220-CNTs es de tipo Th1/Th17.

El análisis histopatológico en pulmones de ratones BALB/c evidenció que los PL220-CNTs no promueven daño pulmonar a la dosis utilizada, lo cual sugiere que su uso es seguro en modelos *in vivo*.

Los hámsteres inmunizados con PL220-CNTs mostraron una baja respuesta humoral (bajos o nulos títulos de anticuerpos). Adicionalmente, se observó una proliferación significativa en cultivos de esplenocitos estimulados con PL220-CNTs y L220. Estos hallazgos, en conjunto, sugieren el establecimiento de una respuesta inmune mayormente de tipo celular.

Los esplenocitos de hámsteres inmunizados con PL220-CNTs mostraron una tendencia en el aumento del IFN- γ e IL-2. Sin embargo, en todos los grupos se detectaron niveles elevados de IL-10 que condicionan una respuesta de tipo Th2. No obstante, los valores de IL-17A exhibieron un aumento significativo en comparación al grupo control y al inmunizado con L220, lo que sugiere el establecimiento de una respuesta de tipo Th17 predominante.

Se confirió protección contra la formación de AHA en hámsteres inmunizados con PL220-CNTs o L220 (100 y 75 % respectivamente). por lo cual se sugiere continuar con su estudio para la formulación de una vacuna efectiva contra la amibiasis.

Estos resultados, en conjunto, demuestran que mediante la inmunización con PL220-CNTs se promueve una respuesta Th17, involucrada en la protección de los animales frente a la infección. Resta la identificación del tipo celular involucrado en la producción de la IL-17A.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PERSPECTIVAS

Es necesario realizar estudios más detallados sobre la interacción de los *PL220*-CNTs con el sistema inmune, a fin de determinar el tipo celular secretor de la IL-17A y como ésta interacciona en el ambiente para conferir protección contra la infección.

ANEXOS

7.1 Homología entre citocinas de *Mus musculus* y *Mesocricetus auratus*.

Con la finalidad de determinar el porcentaje de homología entre las citocinas de *Mus musculus* y *Mesocricetus auratus* y demostrar si los anticuerpos del kit (BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, RUO) podrían utilizarse para identificar las citocinas de hámster, se realizó un análisis informático en Clustal Omega a través del alineamiento de secuencias de aminoácidos de la IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-10 de ambas especies. Los resultados de los porcentajes de identidad se muestran en la Tabla XII. La IL-4 y el IFN- γ mostraron un porcentaje de identidad del 55%, siendo estos los más bajos. Mientras que la IL-2, 6, 10 y TNF mostraron un porcentaje de identidad del 72.9 al 89.7%. Esto indica que hay gran parte de homología entre las citocinas de *Mus musculus* y *Mesocricetus auratus*, lo cual pudiera indicar que los anticuerpos del kit para cuantificar citocinas de ratón pudieran utilizarse para cuantificar citocinas de hámster.

Li *et al.* (2006), utilizaron el kit “mouse Th1/Th2 cytokine CBA kit” (BD Biosciences, Brisbane, QLD), para cuantificar IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ de *Mesocricetus auratus*, y obtuvieron resultados positivos en la cuantificación, esto confirmó que los anticuerpos del kit son útiles para cuantificarlas citocinas de hámster (Li *et al.*, 2006).

Tabla XII. Porcentaje de identidad entre citocinas de *Mus musculus* y *Mesocricetus auratus*.

Citocina	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	IFN γ	TNF
% Identidad	75.48	55.00	72.99	84.83	84.18	55.48	89.70



7.2 Estandarización de la cuantificación de citocinas mediante citometría de flujo.

Las curvas estándar se generaron para cada citocina utilizando el mix estándar de perlas del kit (20 – 5,000 pg/mL). La concentración de citocinas de las muestras se interpoló con su curva estándar correspondiente. Los límites de detección para IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10 fueron de 0.1, 0.03, 1.4, 0.5, 0.9, 0.8 y 16.8 pg/mL, respectivamente. Los valores en la cuantificación de estándares para la determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 estuvieron dentro del rango de aceptación con un coeficiente de determinación (R^2) >99.9%, en la curva de cada una de las citocinas (Figura 24)

La técnica estandarizada permite realizar la determinación de citocinas en sobrenadantes provenientes de los cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c y hámsteres estimulados.

7.3 Obtención de anticuerpos policlonales α -L220 en hámster (pAb).

Para obtener anticuerpos policlonales anti-L220 se procedió a inmunizar un grupo de 4 hámsteres sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) cumpliendo el protocolo de inmunización descrito en métodos. Los resultados obtenidos mostraron que todos los animales tuvieron títulos positivos de anticuerpos anti-L220 que van desde 1:50 hasta 1:1000 después de la aplicación del segundo booster (Figura 10). Este resultado se compara con lo publicado por Rosales-Encina *et al.* (1985) quienes describen que la L220 es una proteína altamente inmunogénica y que es capaz de inducir una respuesta humoral en diversos modelos animales, dentro de ellos el hámster.

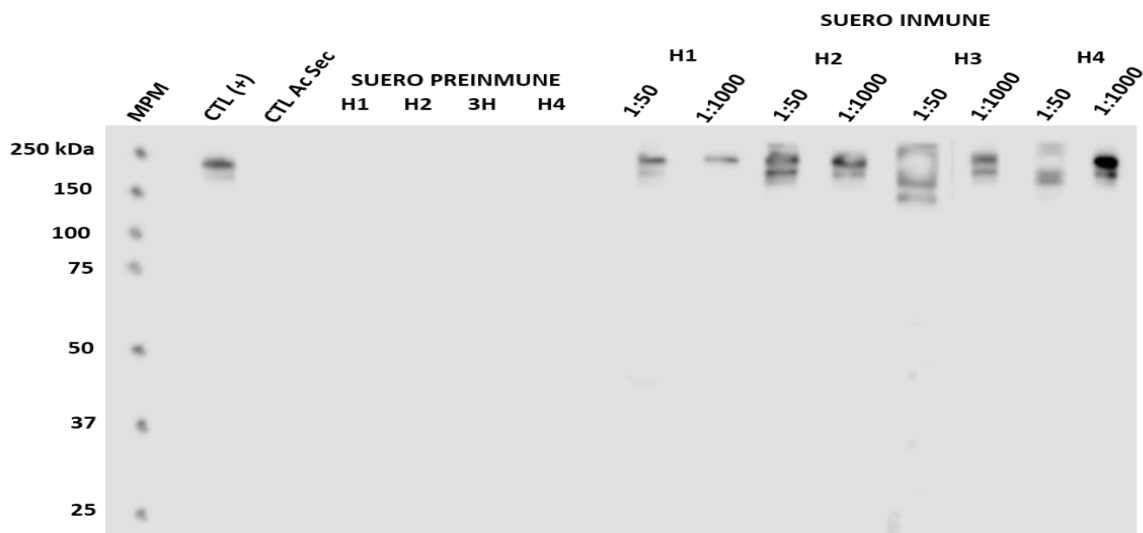


Figura 23. Inmunodetección de anticuerpos anti-L220 mediante western blot en sueros de hámsteres inmunizados. MPM, marcador de peso molecular 25 – 150 kDa; CTL (+), control positivo α -L220; CTL Ac Sec, control anticuerpo secundario; H1, hámster número 1; H2, hámster número 2; H3, hámster número 3; H4, hámster número 4.

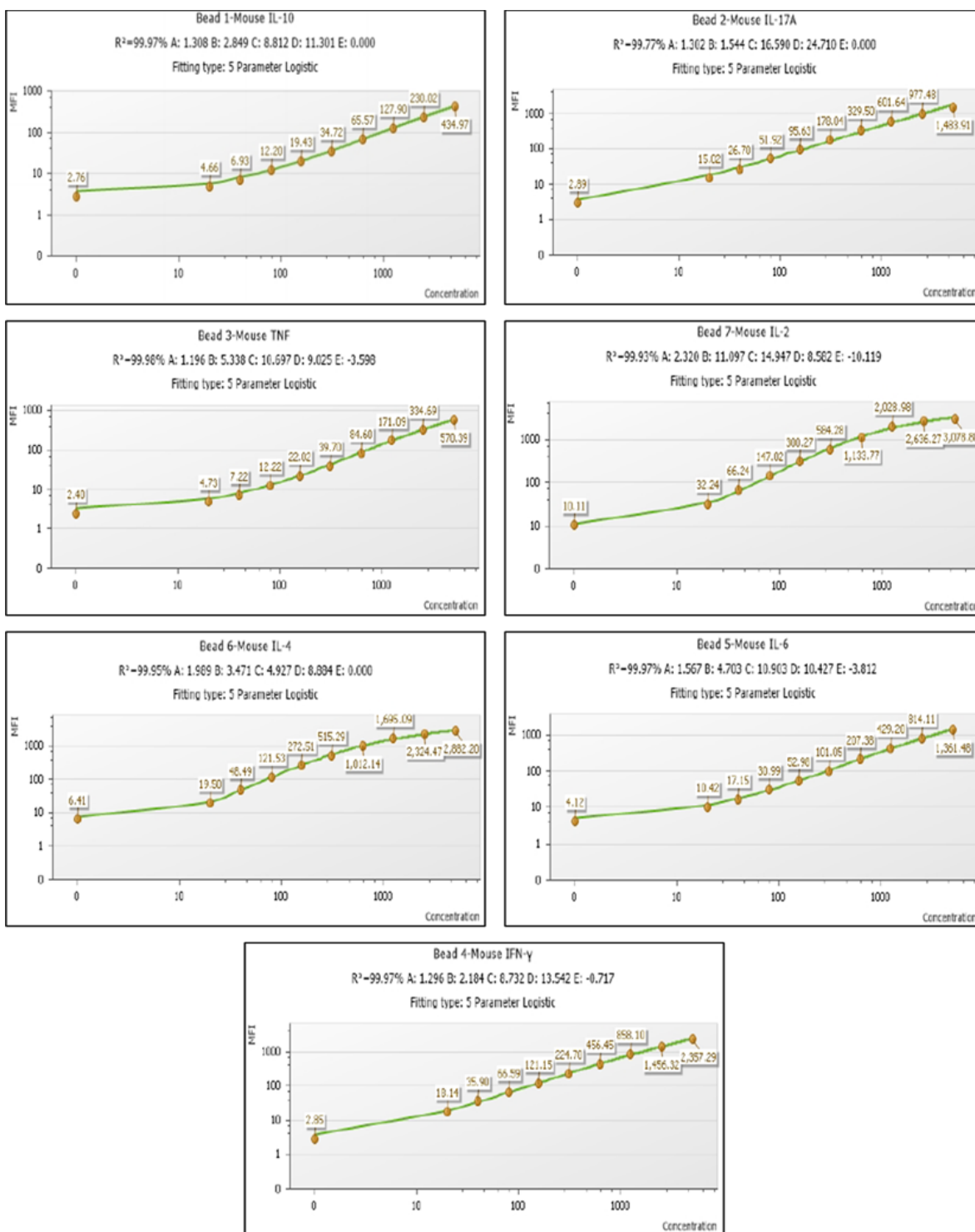


Figura 24. Curvas estándar de citocinas Th1/Th2/Th17.



VII. REFERENCIAS

- Abd-Alla, M. D., Jackson, T. F. G. H., Rogers, T., Reddy, S., & Ravdin, J. I. (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(7), 3897–3903. <https://doi.org/10.1128/IAI.02018-05>
- Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 9–18.
- Andrade, M. L., López, L. I., & Sáenz, A. (2012). Carbon nanotubes: Funcionalization and biological applications | Nanotubos de carbono: Funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(3), 9–18.
- Barroso, L., Abhyankar, M., Noor, Z., Read, K., Pedersen, K., White, R., Fox, C., Petri, W. A., & Lyerly, D. (2014). Expression, purification, and evaluation of recombinant LecA as a candidate for an amebic colitis vaccine. *Vaccine*, 32(10), 1218–1224. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.056](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.056)
- Bernin, H., Marggraff, C., Jacobs, T., Brattig, N., Van An, L., Blessmann, J., & Lotter, H. (2014). Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0621-1>
- Campbell, D., & Chadee, K. (1997). Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor- α responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *Journal of Infectious Diseases*, 175(5), 1176–1183. <https://doi.org/10.1086/520355>
- Chen, R., Lowe, L., Wilson, J. D., Crowther, E., Tzeggai, K., Bishop, J. E., & Varro,



- R. (1999). Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clinical Chemistry*, 45(9), 1693–1694.
- Corpuz, T. M., Vazquez-Lombardi, R., Luong, J. K., Warren, J., Stolp, J., Christ, D., King, C., Brink, R., Sprent, J., & Webster, K. E. (2017). IL-2 Shapes the Survival and Plasticity of IL-17–Producing $\gamma\delta$ T Cells. *The Journal of Immunology*, 199(7), 2366–2376. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700335>
- Cortes, A., Nequiz, M., Sandoval, J., Mendoza, E., Gudiño, M., López-Velázquez, G., Enríquez-Flores, S., Saavedra, E., Pérez-Tamayo, R., & Olivos-García, A. (2019). Mechanisms of natural resistance of Balb/c mice to experimental liver amoebiasis. *Bioscience Reports*, 39(5), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BSR20182333>
- Cuellar, P., Hernández-Nava, E., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Betanzos, A., & Orozco, E. (2017). *Entamoeba histolytica* EhCP112 dislocates and degrades claudin-1 and claudin-2 at tight junctions of the intestinal epithelium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 372.
- Dai, H. (2002). Carbon nanotubes: Synthesis, integration, and properties. *Accounts of Chemical Research*, 35(12), 1035–1044. <https://doi.org/10.1021/ar0101640>
- Dodson, J. M., Lenkowski, P. W., Eubanks, A. C., Jackson, T. F. G. H., Napodano, J., Lyster, D. M., Lockhart, L. A., Mann, B. J., & Petri, W. A. (1999). Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(2), 460–466.
- Dutt, T. S., & Saxena, R. K. (2020). Enhanced antibody response to ovalbumin coupled to poly-dispersed acid functionalized single walled carbon nanotubes. *Immunology Letters*, 217, 77–83.
- Espinosa-Cantellano, M., & Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal



- amebiasis: From molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 318–331. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.318-331.2000>
- Fu, K., Huang, W., Lin, Y., Zhang, D., Hanks, T. W., Rao, A. M., & Suna, Y.-P. (2002). Functionalization of Carbon Nanotubes with Bovine Serum Albumin in Homogeneous Aqueous Solution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(5), 457–461. <https://doi.org/10.1166/jnn.2002.135>
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., & Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: A novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 556–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x>
- Gómez, J., Cortés, J. A., Cuervo, S. I., & López, M. C. (2007). Amebiasis intestinal. *Infectio*, 11(1), 36–45.
- González-Vázquez, M. C., Carabarin-Lima, A., Baylon-Pacheco, L., & Rasales-Encina, J. L. (2012). De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. *Elementos*, 87, 13–18.
- Guo, X., Barroso, L., Becker, S. M., Lyerly, D. M., Vedvick, T. S., Reed, S. G., Petri, W. A., & Houpt, E. R. (2009). Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon. *Infection and Immunity*, 77(9), 3909–3918. <https://doi.org/10.1128/IAI.00487-09>
- Guo, X., Barroso, L., Lyerly, D. M., Petri, W. A., & Houpt, E. R. (2011a). CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*, 29(4), 772–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.013>
- Guo, X., Barroso, L., Lyerly, D. M., Petri, W. A., & Houpt, E. R. (2011b). CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica*



- induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*, 29(4), 772–777. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2010.11.013>
- Guzmán-Mendoza, J., Montes-Fonseca, S. L., Ramos-Martínez, E., González-Horta, C., Hernández-Rodríguez, P. del C., Orrantia-Borunda, E., Chávez-Flores, D., & Sánchez-Ramírez, B. (2020). Safe Administration of Carbon Nanotubes by Intravenous Pathway in BALB/c Mice. *Nanomaterials*, 10(2), 400.
- Haque, R, Huston, C. D., Huges, M., Houpt, E., & Petri Jr, W. A. (2003). Amoebiasis: review article. *New Engl J Med*, 348(16), 1565–1573.
- Haque, Rashidul, Ali, I. M., Sack, R. B., Farr, B. M., Ramakrishnan, G., & Petri, W. A. (2001). Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*, 183(12), 1787–1793. <https://doi.org/10.1086/320740>
- Haque, Rashidul, Mondal, D., Duggal, P., Kabir, M., Roy, S., Farr, B. M., Sack, R. B., & Petri, W. A. (2006). *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infection and Immunity*, 74(2), 904–909.
- Heinrichs, D., Sennekamp, J., Kirsten, A., & Kirsten, D. (2009). Allergische Alveolitis nach Grippeschutzimpfung. *Pneumologie*, 63(9), 508–511. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214909>
- Hirsch, A. (2002). Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(11), 1853–1859.
- Huang, B. (2020). Carbon nanotubes and their polymeric composites: the applications in tissue engineering. *Biomanufacturing Reviews*, 5(1), 1–26.
- Irusen, E. M., Jackson, T. F. H. G., & Simjee, A. E. (1992). Asymptomatic Intestinal Colonization by Pathogenic *Entamoeba histolytica* in Amebic Liver Abscess: Prevalence, Response to Therapy, and Pathogenic Potential. *Clinical Infectious Diseases*, 14(4), 889–893. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.4.889>
- Ivory, C. P. A., & Chadee, K. (2007). Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of



- Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *European Journal of Immunology*, 37(2), 385–394.
- Kirchner, B. Y. H., & Blaese, R. M. (1973). Pokeweed mitogen -, concanavalin a-, and phytohemagglutinin-induced development of cytotoxic effector lymphocytes an evaluation of the mechanisms of t cell-mediated cytotoxicity (Received for publicat. *Journal of Experimental Medicine*, 138, 812–824.
- Kofta, W., & Wedrychowicz, H. (2001). c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veterinary Parasitology*, 100(1–2), 3–12.
- Laughlin, R. C., & Temesvari, L. A. (2005). Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: Prospects for intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(13), 1–19. <https://doi.org/10.1017/S1462399405009622>
- Li, R. W., Theriault, A. G., Au, K., Douglas, T. D., Casaschi, A., Kurowska, E. M., & Mukherjee, R. (2006). Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sciences*, 79(4), 365–373.
- Lin, J. Y., Seguin, R., Keller, K., & Chadee, K. (1994). Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infection and Immunity*, 62(5), 1534–1541. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1534-1541.1994>
- 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. *Cellular Microbiology*, 6(4), 367–376.
- Martínez, M. B., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., Hernández-



- Pando, R., Aguilar, D., & Orozco, E. (2009a). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine*, 27(31), 4176–4186. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.051>
- Martínez, M. B., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., Hernández-Pando, R., Aguilar, D., & Orozco, E. (2009b). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine*, 27(31), 4176–4186.
- Min, X., Feng, M., Guan, Y., Man, S., Fu, Y., Cheng, X., & Tachibana, H. (2016). Evaluation of the C-Terminal Fragment of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit as a Vaccine Candidate against Amebic Liver Abscess. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004419>
- Montes-Fonseca, S. L., Orrantia-Borunda, E., Aguilar-Elguezabal, A., Horta, C. G., Talamás-Rohana, P., & Sánchez-Ramírez, B. (2012a). Cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.10.002>
- Montes-Fonseca, S. L., Orrantia-Borunda, E., Aguilar-Elguezabal, A., Horta, C. G., Talamás-Rohana, P., & Sánchez-Ramírez, B. (2012b). Cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6), 853–859.
- Montes-Fonseca, S. L., Sánchez-Ramírez, B., Luna-Velasco, A., Arzate-Quintana, C., Silva-Cazares, M. B., González Horta, C., & Orrantia-Borunda, E. (2015). Cytotoxicity of protein-carbon nanotubes on J774 macrophages is a functionalization grade-dependent effect. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/796456>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:



- application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology*, 7, 175.
- Pacheco-Yépez, J., Rivera-Aguilar, V., Barbosa-Cabrera, E., ROJAS HERNÁNDEZ, S., JARILLO-LUNA, R. A., & CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. (2011). Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunology*, 33(5), 255–264.
- Peretz, S., & Regev, O. (2012). Carbon nanotubes as nanocarriers in medicine. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(6), 360–368.
- Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2008). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 60–68.
- Que, X., & Reed, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 196–206. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.196-206.2000>
- Ramirez-Emiliano, J., Flores-Villavicencio, L. L., Segovia, J., & Arias-Negrete, S. (2007). Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. *Medicina*, 67(2), 167–176.
- Rosales-Encina, J. L., Meza, I., López-De-León, A., Talamás-Rohana, P., & Rojkind, M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases*, 156(5), 790–797.
- Samaniego-Soto, B. G. (2016). *Caracterización parcial de la respuesta inmune celular contra la proteína inmunogénica 5G8 de Giardia lamblia*. Universidad de Sonora.
- Sánchez-Guillén, M. D. C., Pérez-Fuentes, R., Salgado-Rosas, H., Ruiz-Argüelles, A., Ackers, J., Shire, A., & Talamas-Rohana, P. (2002). Differentiation of



Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(6), 731–737.

Sánchez-Ramírez, B., Escalante, B., Rosales-Encina, J. L., & Talamás-Robana, P. (1997). Role of prostaglandin E2 on amoebic liver abscess formation in hamsters. *Prostaglandins*, 53(6), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(97\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(97)00058-0)

Séguin, R., Mann, B. J., 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(7), 2522–2527. <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2522-2527.1997>

Sharma, M., Vohra, H., & Bhasin, D. (2005). Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology*, 131(6), 783.

Sinnott, S. B. (2002). Chemical Functionalization of Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(2), 113–123. <https://doi.org/10.1166/jnn.2002.107>

Smith, J. D., Morton, L. D., & Ulery, B. D. (2015). Nanoparticles as synthetic vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 217–224.

Stanley Jr, S. L. (2003). Amoebiasis. *The Lancet*, 361(9362), 1025–1034.

Stanley, S. L., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L., & Li, E. (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 4976–4980.

Talamas-Rohana, P., Schlie-Guzman, M. A., Hernandez-Ramirez, V. I., & Rosales-Encina, J. L. (1995a). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2



- subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infection and Immunity*, 63(10), 3953–3958. <https://doi.org/10.1128/iai.63.10.3953-3958.1995>
- Talamas-Rohana, P., Schlie-Guzman, M. A., Hernandez-Ramirez, V. I., & Rosales-Encina, J. L. (1995b). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infection and Immunity*, 63(10), 3953–3958.
- Tran, V. Q., Herdman, D. S., Torian, B. E., & Reed, S. L. (1998). The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 508–511. <https://doi.org/10.1086/517388>
- Trissl, D. (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in Human and Animal Hosts. *Reviews of Infectious Diseases*, 4(6), 1154–1184. <https://doi.org/10.1093/clinids/4.6.1154>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Immune response to the enteric parasite *Entamoeba histolytica*. *Physiology*, 35(4), 244–260.
- Velarde-Calderón, A. (2019). *Respuesta humoral inducida por nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos derivados de la lectina de 220 kDa de Entamoeba histolytica en ratones BALB/c*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Versiani, A. F., Astigarraga, R. G., Rocha, E. S. O., Barboza, A. P. M., Kroon, E. G., Rachid, M. A., Souza, D. G., Ladeira, L. O., Barbosa-Stancioli, E. F., Jorio, A., & Da Fonseca, F. G. (2017). Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0259-4>
- Yi, E. S., Lee, H., Suh, Y. K., Tang, W., Qi, M., Yin, S., Remick, D. G., & Ulich, T. R.



- (1996). Experimental extrinsic allergic alveolitis and pulmonary angiitis induced by intratracheal or intravenous challenge with *Corynebacterium parvum* in sensitized rats. *American Journal of Pathology*, 149(4), 1303–1312.
- Zeinali, M., Jammalan, M., Ardestani, S. K., & Mosaveri, N. (2009a). Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes. *Immunology Letters*, 126(1–2), 48–53.
- Zeinali, M., Jammalan, M., Ardestani, S. K., & Mosaveri, N. (2009b). Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes. *Immunology Letters*, 126(1–2), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.07.012>
- Zhang, T., & Stanley, S. L. (1996). Oral immunization with an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protects gerbils from amebic liver abscess. *Infection and Immunity*, 64(5), 1526–1531. <https://doi.org/10.1128/iai.64.5.1526-1531.1996>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>