

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO  
NITRICO EN MACROFAGOS HUMANOS POR  
ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica*

POR:

M.C. FRANCISCO GONZALEZ SALAZAR

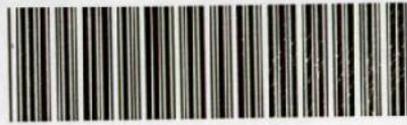
Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
MICROBIOLOGIA

JUNIO DE 2003

INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO  
NITRICO EN MACROFAGOS HUMANOS POR  
ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica*

TD  
RC121  
.A5  
G65  
2003  
c.1

2003



1080124498

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INDUCCIÓN DE PRODUCCIÓN *in vitro* DE OXIDO NÍTRICO EN  
MACRÓFAGOS HUMANOS POR ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica*

POR

M.C. FRANCISCO GONZÁLEZ SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
Especialidad en MICROBIOLOGÍA.

Junio de 2003



TO

RC121

- A5

665

2003



**TITULO DEL PROYECTO:**

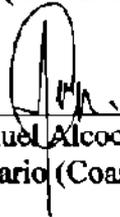
**INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO NITRICO EN  
MACRÓFAGOS HUMANOS POR ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica***

Aprobación por comité de tesis.



---

Dr. Salvador Said Fernández  
Presidente (Asesor de la tesis)



---

Dr. Juan Manuel Alcocér González  
Secretario (Coasesor)



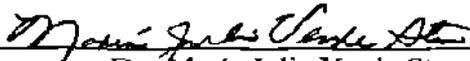
---

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Vocal (Coasesor)



---

Dr. Benito Mata Cárdenas  
(Coasesor)



---

Dra. Maria Julia Verde Star  
Subdirectora de Estudios de Postgrado



**El presente trabajo se realizó en:**

**División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.**

**Departamento de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Director de tesis:**

**Dr. Salvador Said Fernández**

**Asesores:**

**Dr. Juan Manuel Alcocér González**

Departamento de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL

**Dr. Benito Mata Cárdenas**

División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

**Dra María Julia Verde Star**

Subdirección de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **DEDICATORIA**

**Quiero dedicar mi trabajo a las personas a quien más amo**

**Especialmente a ti:**

**ERIKA PAOLA**

**A mis hijos**

**SAMUEL y SAID GONZÁLEZ MORENO**

**A mis padres:**

**FRANCISCO GONZÁLEZ GONZÁLEZ  
ANDREA SALAZAR DE GONZÁLEZ**

**A mis hermanos:**

**CARMEN, RICARDO, SILVIA GUDALUPE, EMANUEL Y ELISA  
MARIA GONZÁLEZ SALAZAR**

**A todos mis sobrinos:**

**VICTOR; ALEJANDRO; GUILLERMO; ANDREA; JACOBO;  
ABRAHAM; ANDRES, ISAAC,y LUCERO y JUDITH ALEJANDRA**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Ahora en esta nueva era, un nuevo siglo comienza y es frecuente hablar de la red, del ciber espacio, de recibir e:mails, transferencias de información electrónicas, fotografías digitales, escáneres muy poderosos, manipulación de la información genética, creación de nuevos seres por clonación, de curación de enfermedades antes incurables. Mas sin embargo existen situaciones y enfermedades oton sencillas aún sin poder ser esclarecidas sus causas, su forma de producir daño, sin adecuadas formas de prevención e inclusive hay personas y niños que mueren o tienen secuelas por estas enfermedades. Quiero agradecer a DIOS por la oportunidad de vivir en esta era, y de poder dedicar mi tiempo en atender estos sencillos problemas, que ocasionan tanta preocupación a mis colegas médicos y que finalmente dañan la intimidad de la familia y la del ser humano.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología les debo la oportunidad de formarme como investigador, por todo el apoyo económico y académico recibido, mil gracias.

Con toda la admiración y respeto que se merece...

**Al Dr. Salvador Said y Fernández**

Director de esta tesis, excelente persona, un gran maestro, extraordinario asesor y un buen amigo que tuvo a bien haberme aceptado como su alumno y que siempre me mostró que en la ciencia se requiere además de un gran entusiasmo una buena dosis de disciplina, buen juicio y autocrítica.

**Al Dr. Juan Manuel Alcocer González**

Co-Director de esta tesis; fue quién despertó en mí, el interés por incursionar mas a fondo en el interesante campo de la inmunología. Le agradezco la sinceridad en su trato su continua disposición para atender mis dudas, y por ser un excelente maestro director y guía para conmigo en el desarrollo del presente trabajo.

**A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

De quien recibí muy valiosas observaciones para el desarrollo del presente trabajo, gracias por su valioso tiempo, por su colaboración y amistad.

**Al Dr. Benito Mata Cárdenas**

Le agradezco el estar siempre dispuesto a ayudarme en todos los aspectos relacionados con la presente tesis y fuera de ella. Por su gran compañerismo y su amistad, gracias.

**A la Dra. María Julia Verde Star**

Siempre dispuesta a ayudar, continuamente impulsando positivamente mi trabajo, con un gran sentido de responsabilidad y humanismo, por su gran calidez humana, gracias.

A mis compañeros de laboratorio Rebeca Palacios, Javier Vargas, Leticia Navarro, Pola Becerril, Manuel Rodríguez y la Dra. Karina González. Quienes mostraron una gran paciencia, tolerancia, cooperación y, solidaridad, además compartieron conmigo toda su experiencia y me brindaron incondicionalmente su amistad ¡Gracias!

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas, con quienes compartí momentos agradables y desafortunados, vivencias y momentos que guardo para siempre en mi mente y mi corazón.

A todo el personal de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la UANL. Que acertadamente dirige la Dra. María Julia Verde Star, quienes me facilitaron todos los trámites administrativos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a un servidor para soportar mis estudios de postgrado.

Al personal de la biblioteca del CIBIN por las facilidades otorgadas a un servidor para la obtención de material bibliográfico.

Al médico Antonio Luna De la Rosa por el apoyo con el arte gráfico necesario para el desarrollo de mi trabajo.

En general a todas las personas que de una u otra forma colaboraron conmigo y me ayudaron a realizar mi trabajo

**¡Gracias!**

## NOMENCLATURA

AHA absceso hepático amibiano

ATA Antígeno total amibiano

BCG Vacuna de bacilos de Callmete y Guerin contra tuberculosis

°C Grados centígrados

cm Centímetros

cols. Colaboradores

dl Decilitro

DNA Acido desoxiribonucleico

EHP Extracto de hígado y páncreas

g Gramos

Gal/GalNAc Lectina que tiene afinidad por Galactosa

g/dl gramos por decilitro

h Horas

HCl Ácido clorhidrico

HLA Antígenos de histocompatibilidad

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

iNOS Sintetasa del óxido nítrico inducible

IL-1 Interleucina 1

INF- $\gamma$  Interferón gamma

kDa Kilodaltons

kg Kilogramos

L Litros

***M*** Concentración molar

***mM*** Concentración micromolar

***MΩ*** Megaohms

***mg*** Miligramos

***mg/ml*** Miligramos por ml

***min*** Minutos

***MHC*** Complejos de histocompatibilidad

***ml*** Mililitros

***μl*** Microlitros

***mm*** Milímetros

***NaOH*** Hidróxido de sodio

***N*** Concentración normal

***NO*** Óxido nítrico

***PEHPS*** Medio de cultivo PEHPS

***RNA*** Ácido ribonucleico

***rpm*** Revoluciones por minuto

***RPMI*** Medio de cultivo RPMI-6420

***SREHP*** Antígeno proteico rico en serina

***Vols*** Volúmenes

***SCID*** Ratones con inmunodeficiencia combinada severa

***TNF-α*** Factor de necrosis tumoral alfa

***× g*** Fuerza centrífuga

***WHO*** Organización mundial de la salud

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>CAPITULO 1</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Amibiasis</b>	<b>1</b>
<b>1.2 El ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>:</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Taxonomía</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Aspectos generales de las respuestas humoral y celular.</b>	<b>2</b>
<b>1.5 Aspectos inmunológicos relacionados con la relación huésped/ parásito en la amibiasis.</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Importancia del Óxido Nítrico en la respuesta celular anti-<i>E. histolytica</i></b>	<b>9</b>
<b>1.7 Antígenos amibianos inductores de la respuesta inmune celular.</b>	<b>11</b>
<b>1.8.- Importancia de la inmunidad celular en la protección contra el desarrollo de AHA en animales inoculados experimentalmente</b>	<b>13</b>
<b>1.9. El problema</b>	<b>14</b>
<b>1.10 Originalidad</b>	<b>15</b>
<b>1.11 Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>1.12 Objetivo general</b>	<b>16</b>

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>1.13. Objetivos específicos</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO 2</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL</b>	
<b>2.1 Origen de los reactivos:</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Material biológico:</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Amibas:</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2 Células mononucleares de sangre periférica:</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Preparación de los Medios de Cultivo</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Extracto de Hígado y Páncreas (EHP)</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2 Preparación del PEHPS</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3 Preparación del medio RPMI</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Composición y Preparación de las Soluciones</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2 Solución de Tris HCl, pH 8.0</b>	<b>23</b>
<b>2.4.3. LPS</b>	<b>23</b>
<b>2.4.4 Solución de albúmina</b>	<b>24</b>
<b>2.4.5 Solución de glutaraldehido</b>	<b>24</b>
<b>2.4.6 Solución de fitohemaglutinina:</b>	<b>24</b>
<b>2.4.7.- Solución de [<sup>3</sup>H- Timidina] ([<sup>3</sup>H]-TdR)</b>	<b>25</b>
<b>2.4.8.- Soluciones para cuantificar nitritos</b>	<b>25</b>

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>2.4.9. Azul de Tripano al 0.1%</b>	<b>25</b>
<b>2.4.10 Soluciones para cuantificación de proteínas por el método de Lowry et al., (1951)</b>	<b>25</b>
<b>2.4.11 Soluciones para cuantificar nitritos por el método de Griess (Green, 1982)</b>	<b>26</b>
<b>2.5 METODOS</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 Preparación de antígeno amibiano total</b>	<b>27</b>
<b>2.5.2 Cuantificación de proteínas:</b>	<b>29</b>
<b>2.5.3 Separación de células mononucleares de sangre periférica.</b>	<b>30</b>
<b>2.5.4 Determinación de la viabilidad de CMP</b>	<b>31</b>
<b>2.5.5 Activación de linfocitos de sangre venosa periférica utilizando antígenos amibianos.</b>	<b>32</b>
<b>2.5.6 Determinación de la producción de NO en cultivos de CMP.</b>	<b>33</b>
<b>2.5.7 Cuantificación de nitritos</b>	<b>34</b>
<b>2.5.8 Determinación de la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano:</b>	<b>35</b>
<b>2.5.9 Inhibición de la presentación del antígeno utilizando glutaraldehído.</b>	<b>36</b>

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
<b>2.5.10 Digestión del ATA con tripsina:</b>	<b>37</b>
<b>2.5.11 Producción de NO por CMP estimuladas con ATA digerido con tripsina:</b>	<b>37</b>
<b>2.5.12 Separación de fracciones del antígeno amibiano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).</b>	<b>38</b>
<b>2.5.13 Preparación de las fracciones de antígeno amibiano obtenidas por HPLC para el bioensayo de producción de NO.</b>	<b>39</b>
<b>2.5.14 Determinación de la capacidad de las fracciones de antígeno amibiano separadas por HPLC para inducir la producción de NO.</b>	<b>39</b>
<b>2.5.15 Inducción de la activación de los macrófagos humanos por fracciones del antígeno amibiano para matar trofozoitos de <i>E. histolytica in vitro</i>.</b>	<b>40</b>
<b>CAPITULO 3</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>3.1 Inducción de proliferación de linfocitos humanos por antígeno amibiano</b>	<b>42</b>
<b>3.1.1 Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado en cultivos de células mononucleares periféricas.</b>	<b>42</b>

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>3.1.2.- Relación temporal de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado.</b>	<b>43</b>
<b>3.1.3.- Proliferación de CMP inducida en función de la dosis de ATA.</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Estimulación de la producción de NO por ATA.</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Co-estimulación de CMP humanas por ATA, LPS e Interferón-γ.</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Inhibición de la producción de NO por inhibición en la presentación del antígeno.</b>	<b>50</b>
<b>3.5 Separación de fracciones del antígeno amibiano por HPLC</b>	<b>51</b>
<b>3.5.1 Fraccionamiento del ATA por HPLC.</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Inducción de producción de NO por fracciones separadas por HPLC</b>	<b>52</b>
<b>3.6.1 Inducción de producción de NO por las fracciones de ATA.</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Citotoxicidad sobre amibas de CMP activadas con los péptidos purificados por HPLC.</b>	<b>54</b>
<b>CAPITULO 4</b>	<b>56</b>
<b>DISCUSION</b>	
<b>4.1 Discusión</b>	<b>56</b>

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>CAPITULO 5</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSION</b>	
<b>5.1 Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>5.2 Perspectivas</b>	<b>68</b>
<b>5.3 Contribuciones</b>	<b>70</b>
<b>CAPITULO 6</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>6.1 Bibliografía</b>	<b>72</b>

## INDICE DETABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Tabla 1. Curva estándar de seroalbúmina bovina</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 2.- Muestra los ingredientes de cada grupo de pozos durante el ensayo para determinar la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 3. Programa de elución de las fracciones del antígeno amibiano digerido con tripsina.</b>	<b>38</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1.- Separación de células mononucleares periféricas</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR por CMP en presencia de ATA particulado.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 3.- Relación temporal de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por ATA particulado en cultivos de CMP.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 4.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR en función de la dosis de ATA particulado.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 5.- Efecto de la dosis y el tiempo de incubación sobre la producción de NO.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 6.- Relación temporal y efecto de diferentes concentraciones de ATA para inducir producción de NO.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 7.- Co-estimulación de ATA con LPS e INF-<math>\gamma</math>.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 8.- Capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 9.- Efecto del bloqueo en la presentación del antígeno sobre la producción de NO.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 10.- Separación de fracciones del ATA por HPLC.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 11.- Inducción de la producción de NO por las fracciones del ATA separadas por CLAR.</b>	<b>53</b>

<b>Figura 12.- Inducción de producción de NO en fracciones de HPLC con concentraciones estandarizadas de antígeno.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 13.- Actividad citotóxica de macrófagos activados con los péptidos bioactivos sobre trofozoítos.</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

**Francisco González Salazar**

**Fecha de graduación: Junio, 2003**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

### **Título del Estudio:**

**INDUCCION DE PRODUCCIÓN *in vitro* DE OXIDO  
NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS POR  
ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica***

**Número de páginas: 83**

**Candidato para el grado de Doctor en**

**Ciencias con especialidad en Microbiología**

**Area de estudio: Microbiología médica**

### **Propósito y método del estudio**

La amibiasis, causada por *Entamoeba histolytica* es un problema de salud pública. La vacunación es la forma más efectiva para controlar las enfermedades infecciosas y parasitarias como la amibiasis. El óxido nítrico (NO), producido por macrófagos activados, es la principal molécula efectora en esta respuesta inmune contra *E. histolytica*. Se desconoce si existen antígenos capaces de inducir esta respuesta en células mononucleares periféricas (CMP) humanas. El objetivo del presente proyecto fue identificar antígenos de *Entamoeba histolytica* capaces de inducir esta respuesta, mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se utilizaron trofozoitos virulentos de la cepa HM-1-IMSS. Se obtuvo el antígeno amibiano total, libre de actividad de proteasas endógenas (ATA), el cual se utilizó directamente en forma particulada o soluble. Las CMP se obtuvieron de un voluntario con antecedentes de disentería amibiana. Se realizaron los siguientes ensayos en microplacas de 96 pozos: Activación de linfocitos por efecto de ATA soluble y ATA particulado, producción de NO en cultivos de CMP inducidos con LPS, ATA soluble o particulado, efecto del ATA digerido con tripsina sobre la producción de NO por CMP, separación de fracciones del antígeno amibiano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Determinación de la capacidad de las fracciones de antígeno amibiano separadas por HPLC para inducir la producción de NO. Capacidad lítica de macrófagos activados por los antígenos amibianos separados por HPLC.

## **Contribuciones y conclusiones.**

El ATA es capaz de inducir proliferación de linfocitos en cultivos de CMP. El ATA induce producción de NO en cultivos de macrófagos obtenidos de sangre periférica humana. La inducción de producción de NO en cultivos de macrófagos humanos obtenidos de CMP, se incrementa por co-estimulación con INF  $\gamma$  o LPS. La inducción de producción de NO en cultivos de macrófagos humanos obtenidos de CMP, es dependiente de la presentación del antígeno. Las fracciones del ATA digeridas con tripsina y separadas por HPLC son capaces de inducir la producción de NO en presencia de LPS. Los macrófagos humanos de cultivos de CMP, activados con las fracciones 4 y 9 separadas por HPLC. Inducen la producción de NO, además son capaces de destruir trofozoítos *in vitro*. Nuestros resultados sostienen la hipótesis planteada en el presente trabajo.

Las principales contribuciones del presente trabajo son las siguientes: Demostramos que las CMP humanas son un modelo confiable y reproducible para analizar respuestas inmunes celulares contra antígenos de *E. histolytica*. Aislamos e identificamos dos fracciones de antígenos de *E. histolytica* que son capaces de inducir la producción de NO en cultivos de macrófagos humanos. Estos antígenos son capaces de activar a macrófagos humanos obtenidos de sangre periférica e incrementar su capacidad lítica sobre amibas virulentas *in vitro*. Abrimos un nuevo camino, con enfoque promisorio y estrategias novedosos; considerando los fundamentos de nuestra estrategia y los resultados aquí mostrados, para el desarrollo de una vacuna contra la amibiasis.

## **SUMMARY**

### **Purpose and methods of study**

Amoebiasis, caused by *Entamoeba histolytica*, is a public problem in developing countries. Vaccination is the most effective way to control most of infectious and parasitic diseases, like amoebiasis. Nitric oxide (NO), produced by activated macrophages, is the major effector molecule in the protective immune cell response against invasive *E. histolytica*. At date none *E. histolytica* antigen, capable of induce NO production in human macrophages, dependent of lymphocytes T CD 4<sup>+</sup> has been described. The objective of the present study was to identify *E. histolytica* antigens capable to induce this response *in vitro*.

*E. histolytica* HM-1 IMSS strain was used. The total amoebae antigen (TAA), free of endogenous-protease activity was prepared in soluble or particulate presentations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from a healthy participant who had amebic dysentery. The following assays were performed in 96-well culture microplates: 1) Peripheral lymphocyte activation by soluble- or particulate-ATA. 2) Determination of NO-production in PBMC induced with lipopolysaccharides (LPS) or soluble- or particulate-ATA. 3) Digestion of soluble-ATA with Trypsin. 4) Induction of NO production by digested ATA in CMP. 5) Fractionation of ATA digested with trypsin by high performance liquid chromatography (HPLC). 6) Determination of capability to induce NO production by the fractions of ATA obtained by HPLC. 7) Determination of cytotoxic capability of activated-macrophages stimulated with the antigen-fractions.

#### **Contributions and conclusions.**

ATA is capable of inducing lymphocyte proliferation in PBMC cultures, with an efficiency similar to phytohemagglutinin. ATA induces production of NO in human macrophages. The production of NO induced by ATA in PBMCs can be co-stimulated by INF  $\gamma$  o LPS, which indicates that this is not an unspecific response. Production of ATA depends on antigen presentation 4 and 9 HPLC-fractions are capable to induce a remarkable high production of NO. Human macrophages from PBMC cultures activated by HPLC-fractions numbers 4 and 9 fractions able to macrophages to kill amoebae.

#### **CONTRIBUTIONS**

We demonstrated that human PBMC are a confident model to analyze the cellular immune response induced by *E. histolytica* antigens. We isolated and identified two fractions of *E. histolytica* capable to induce *in vitro* production of NO in human macrophages. We showed that these antigens are capable to activate human macrophages and improve their lytic activity against virulent amoebae *in vitro*. We open a new way, with an interesting a novel promissory strategies, to design and develop a new vaccine against amebiasis.

Firma del Asesor \_\_\_\_\_

Dr. Salvador Said Fernández.