

## V. Diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas.

Salvador Said-Fernández,\* Francisco González-Salazar\* Herminia G. Martínez-Rodríguez\*\*

### Resumen

*Las vacunas son la forma más efectiva y económica de prevenir y controlar enfermedades infecciosas y parasitarias. A pesar del gran desarrollo que este tipo de biológicos ha experimentado en los últimos años, todavía hay enfermedades producidas por virus, como el SIDA y por protozoarios, como la amibiasis y la tripanosomiasis, que no han podido ser controladas mediante vacunas eficaces y seguras. La vacuna contra la malaria es una de las que mayor éxito ha tenido. Pero todas éstas aún están en pleno desarrollo. Existen numerosos factores que se oponen al éxito de las vacunas antes mencionadas. Algunos de ellos son el riesgo que se corre al utilizar virus vivos o DNA, en el caso del SIDA o de la capacidad que tienen los protozoarios para evadir, deprimir o inactivar la respuesta inmune protectora del huésped. Una vacuna efectiva debe inducir tanto la respuesta humoral como la respuesta celular del sistema inmune y considerar el ciclo biológico del agente causal. Se discuten aquí diversas y novedosas estrategias para desarrollar vacunas tanto contra SIDA como contra la amibiasis.*

**Palabras clave:** Vacunas, infecciones, protozoarios

### Introducción

Una vacuna puede salvar más vidas y más dinero que cualquier otra intervención médica.<sup>1</sup>

Hasta hace relativamente poco tiempo el concepto de vacuna se aplicaba exclusivamente a la prevención de enfermedades infecciosas y fue hasta hace poco más de 30 años que empezaron a aparecer resultados prometedores sobre el desarrollo de vacunas dirigidas contra enfermedades

### Summary

*Vaccines are the most effective and reliable way to prevent and control infectious and parasitic diseases. In spite of the great development that this kind of biological products has reached over the past years, certain viral diseases, like AIDS and most of those produced by parasitic protozoa, like amebiasis and trypanosomiasis, still have not been controlled by means of safe and effective vaccines. Vaccine against malaria is one that has shown greater success. Accordingly, all are still being developed. Numerous factors oppose success. For example, one is the risk that includes the use of live viruses or their DNA, in the case of HIV or the ability that some protozoa have to depress, evade, or inactivate the protective immune response. An effective vaccine must induce both the humoral and the cellular branches of the immune system, and in addition to considering the entire biological cycle of the causative agent. In this contribution, several novel strategies to develop vaccines against amebiasis and AIDS are discussed.*

**Key words:** Vaccines, parasitic diseases

causadas por parásitos, las cuales están aún en pleno desarrollo.

De acuerdo con Adrian J. Ivinson<sup>1</sup> existen tres conceptos sobre las vacunas modernas que deben considerarse con especial atención para lograr los efectos benéficos deseados: (a) aspectos biológicas, (b) su costo/beneficio y (c) la cooperación internacional para aplicarlas en la mayor cantidad posible de personas en las áreas del mundo donde se les requiere.

\* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Col. Independencia, Monterrey, N.L. C.P. 64720. México.

\*\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave. Eduardo Aguirre Pequeño y Ave. Madero, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Said Fernández Centro de Investigación Biomédica del Noreste Ave. 2 de Abril y San Luis Potosí Col. Independencia Apdo Postal 020E 64 720 Tel y Fax (018) 1-90-40-35 E. mail: salvadorsaid@netscape.com

Nosotros dedicaremos esta contribución a un tema relacionado con las características biológicas de las vacunas: su diseño, desarrollo y resultados, sin pretender que ésta sea una revisión exhaustiva. Nuestro objetivo es sólo presentar algunos ejemplos sobre las estrategias más sobresalientes que se están abordando para desarrollar vacunas contra dos enfermedades importantes por su incidencia y mortalidad y que por las características biológicas de sus agentes causales ha sido extraordinariamente difícil desarrollar productos que protejan en forma segura, efectiva y duradera. Estas dos enfermedades son el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), uno de los retrovirus más complejos conocidos hasta ahora; y la Amibiasis, cuyo agente causal es el protozoario *Entamoeba histolytica*. El desarrollo de las vacunas contra el SIDA y enfermedades causadas por protozoarios está planteando a los investigadores difíciles y variados problemas, que como veremos aquí, han requerido de la mayor creatividad e ingenio y dedicación por parte de los investigadores, quienes han puesto a prueba los enfoques y tecnología más modernos y variados.

## Vacunas contra el SIDA

### *Importancia epidemiológica del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida*

El SIDA es una enfermedad extendida en todo el mundo y sus tasas de incidencia y mortalidad van en aumento. Durante 1997 se infectaron en el mundo 5.8 millones de personas con el virus del SIDA (VIH). Se estima que a principios de 1998 había en el mundo 30.6 millones de personas VIH-positivas. Más de 40% de estas personas eran mujeres y la mitad de ellas tenía una edad de 15 a 24 años.<sup>2</sup>

### *Características generales del VIH*

El VIH es un retrovirus. Su genoma está constituido por RNA, el cual se replica por medio de un DNA intermediario de doble cadena, dentro de la célula blanco. El virus está envuelto por una cubierta por la membrana plasmática de la célula blanco

que contiene glicoproteínas de cubierta (Gp 160 y Gp41), codificadas por el propio virus y que le sirven como medios de reconocimiento y anclaje a receptores específicos, en primera instancia a los macrófagos circulantes y después a los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Gp 41 es responsable de la fusión de la membrana del virus con la de la célula blanco.<sup>2</sup> Dentro de la cubierta se encuentra el genoma con un tamaño de 9.2-kbp y la transcriptasa reversa, encargada de sintetizar la doble cadena de DNA, usando como templado el genoma original del virus, inmediatamente después de la infección.<sup>3</sup> Desde el punto de vista inmunológico, el producto génico más importante es el de *env*, que codifica para las proteínas de cubierta Gp 120 y Gp 41.

### *Ciclo biológico de VIH-1*

El virión VIH-1 rodeado de la glicoproteína de cubierta Gp 120 se une a dos co-receptores de superficie de los macrófagos circulantes: CD4 y CCR5.<sup>4</sup> Las membranas celulares se fusionan, y el virus entra a la célula. Entonces se liberan el genoma y la transcriptasa reversa virales. La transcriptasa reversa sintetiza una copia de DNA de doble cadena, la cual entra al núcleo y se integra al DNA celular. En este estado el VIH se llama provirus. Después se sintetizan y ensamblan las proteínas de VIH dentro de las células infectadas y el virus adquiere una cubierta lipídica, la cual contiene numerosas copias de Gp120 y Gp41 y abandona la célula mediante un proceso de gemación.<sup>5</sup>

### *Vacunas contra el VIH<sup>6</sup>*

El diseño de una vacuna capaz de proteger contra el SIDA sigue siendo un reto tan grande como cuando el virus estaba recién descubierto. Algunas de las razones más sobresalientes son las siguientes:

- (a) La respuesta inmune natural no destruye al VIH y se forman reservorios de éste, principalmente en el cerebro, en células de la microglia.
- (b) Ha sido necesario evitar el uso de virus completos vivos, atenuados o muertos, porque éstos representan un peligro potencial para las personas.

La proteína de cubierta Gp 120 puede mutar con el tiempo y unirse tanto a los co-receptores CD4 y CCR5 como a los timocitos portadores de CD4<sup>+</sup> (T CD4), y de un cofactor llamado CXCR4 como a los cofactores CD4 y CCR5 de los macrófagos, como ocurre en la fase inicial de la enfermedad. En la fase tardía del SIDA la mayor parte de los virus pueden cambiar su afinidad exclusivamente por los correceptores de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y convertirse en "T-trópicos". En este estado los virus destruyen a las células T infectadas, contribuyendo fuertemente al colapso del sistema inmune y al surgimiento de la fase clínica de la enfermedad<sup>4</sup>. Actualmente se conocen seis co-receptores más, además de CCR5 y CXCR4. En todos los casos el virus VIH se une a CD4 y a uno de los otros factores.<sup>2</sup>

#### *Vacunas para estimular la respuesta humoral*

Este tipo de vacunas ha probado su eficacia para combatir enfermedades como la poliomielitis, el sarampión y la influenza. En el caso del SIDA los diseños de vacunas más sobresalientes son los siguientes:

*Proteínas de cubierta (Env).* La mayor parte de este tipo de vacunas contienen proteínas de la cubierta viral o parte de éstas, porque siendo estas proteínas necesarias para la unión del virus con la célula blanco, al unírsele anticuerpos específicos neutralizan su función y el virus es incapaz de infectar. Estas vacunas, dirigidas contra Gp 160, o contra Gp 120 y Gp 41 (que se derivan de la primera) ya han sido probadas en voluntarios humanos y se ha observado que se generan anticuerpos capaces de neutralizar virus vivos, eliminando su habilidad para infectar macrófagos humanos *in vitro*. Sin embargo, estos anticuerpos sólo reconocen a las cepas de VIH que se usaron en las vacunas. Cuando se usaron cepas aisladas de pacientes estas vacunas fueron ineficaces. Entonces, las proteínas de cubierta puras parecen no ser los mejores candidatos para la vacuna.

#### *Virus completos*

Los virus completos, muertos, podrían presentar al sistema inmune una forma más natural de las proteínas de la cubierta, y por lo tanto estimular la

producción de anticuerpos más eficaces para neutralizar la capacidad de infectar del VIH. Sin embargo, este enfoque implica el peligro de inocular eventualmente virus activos o el material genético residual, que es potencialmente peligroso. Por lo tanto deberá tenerse un especial cuidado para inactivar a los virus; y por otro lado, un tratamiento demasiado estricto para inactivar a los virus podría hacer a la vacuna menos efectiva, porque podría desprender y eliminar a las proteínas de la cubierta. Este es un buen enfoque, aunque deberá resolverse el problema de la estabilidad de las proteínas de cubierta.

*Pseudoviriones.* Estas son estructuras artificiales parecidas a los virus. Son esferas lipídicas vacías que sólo portan a la Gp 160. Estas estructuras son muy seguras porque no tiene la capacidad de infectar ni de hacerse reproducir por las células blanco. Sin embargo no es fácil fabricar pseudoviriones estables, aunque hay muchas esperanzas para lograrlo en un corto plazo.

#### *Vacunas para estimular la respuesta celular*

Las células citotóxicas reconocen epitopos. Los cuales son fragmentos de los antígenos presentados a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la superficie de las células infectadas. Estos epitopos, en el momento de ser presentados, están ensamblados en los antígenos HLA, clase I. En este caso, no sólo los antígenos de superficie, sino también las proteínas internas pueden ser procesadas y presentadas a los linfocitos citotóxicos. En el caso de la vacuna contra el SIDA se deben seleccionar células específicas que sintetizen y expongan uno o más de los epitopos provenientes de las proteínas cuya síntesis es dirigida por el virus. De esta forma se podría inducir al sistema inmune a montar una respuesta contra todas las células infectadas que presenten en su superficie dichos epitopos.

*Vacunas con vectores vivos.* Esta modalidad de vacunas aprovecha la capacidad de ciertos virus (no VIH) para invadir células. La estrategia consiste en insertar genes del virus del VIH en estos virus, que no son patógenos para el hombre, permitiendo que estos agentes liberen dentro de las células los genes que codifican para los antígenos inductores de la respuesta inmune pro-

tectora. La célula entonces produce las proteínas virales, las reduce a epitopos y estos son presentados en su superficie para activar a los linfocitos T, los cuales se activarán y formarán células de memoria, los que estarán listos para combatir una infección por VIH. Uno de los virus más usados para esta estrategia es el virus de la viruela de los canarios, un virus relacionado con el virus de la viruela humana, el cual ha sido transformado con los genes del VIH que codifican para las proteínas de la cubierta y para proteínas internas, como Gag (la proteína del núcleo viral y la proteasa. Estas vacunas son seguras y despiertan una débil respuesta celular. La respuesta se ha mejorado haciendo producir a los virus vectores un mayor número de copias o una mayor variedad de proteínas del HIV dentro de las células infectadas por el virus vacunal.

**Péptidos.** Se ha intentado despertar la respuesta inmune celular inyectando péptidos, pero éstos pueden degradarse antes de llegar a su destino. La inducción de la respuesta inmune por este tipo de moléculas podría incrementarse usando mejores adyuvantes.

**DNA desnudo.** En primates y ratones la vacuna ha estimulado la respuesta de linfocitos T y en algunos experimentos ha protegido a los animales de la infección.

**Estrategias combinadas.** Las estrategias más efectivas son aquellas que estimulan tanto a la respuesta celular como a la humoral. Por ejemplo, un programa de vacunación de éstos podría iniciarse con un virus de la viruela de los canarios portando el gen que codifica para las proteínas de cubierta, para estimular la respuesta celular, y meses después el mismo paciente podría recibir la Gp120 pura, para estimular la respuesta humoral. Con la primera vacuna se prepara a las células para una infección y con la segunda se refuerza.

Ya se ha hecho las primeras pruebas en seres humanos con este enfoque, pero se usaron antígenos de virus preparados en el laboratorio y se obtuvo una respuesta débil.

#### *VIH y VIS modificados mediante ingeniería génica*

Muchos investigadores siguen pensando que el uso de virus del VIH vivo es la mejor forma de inducir una respuesta protectora. Para ello han estado

deletando sistemáticamente varios de los genes que este virus usa para replicarse. Un protocolo con médicos voluntarios se está llevando a cabo para probar esta vacuna.

Por otro lado se ha observado que el virus de la inmunodeficiencia de los primates, mal llamados simios (VIS) atenuados ha resultado seguro y demostrado su capacidad para inducir una respuesta protectora notablemente efectiva en estos animales. Sin embargo, en algunos casos estas vacunas han inducido síntomas de inmunodeficiencia, aún en animales no retados con el virus silvestre.

#### **Vacunas contra amibiasis**

La amibiasis es causada por *Entamoeba histolytica*. Se estima que afecta a 10% de la población mundial,<sup>7</sup> pero es muy probable que estas cifras tengan que reconsiderarse en un futuro cercano debido a que *E. Dispar* (una especie no patógena) también parasita al intestino humano, y hasta hace poco tiempo no se le distinguía de la primera.<sup>8</sup> Se estima que la amibiasis es causa 110 mil muertes al año.<sup>9</sup>

Las dos observaciones más generales acerca de que *E. histolytica* es capaz de despertar una respuesta inmune son: (a) que la frecuencia de reinfecciones por *E. histolytica* en pacientes recuperados de absceso hepático amibiano (AHA) es muy baja<sup>11</sup> y b) que los animales de laboratorio vacunados contra *E. histolytica* desarrollan una respuesta protectora contra abscesos hepáticos amibianos (AHA) o lesiones intestinales cuando se les inocula experimentalmente con amibas virulentas o disentería amibiana, lo cual discutiremos más adelante. Sin embargo el diseño de una vacuna confiable contra la amibiasis plantea una serie de dificultades, que deberán superarse para lograr el objetivo deseado.

Deben además tomarse en cuenta dos aspectos muy importantes de la biología de *E. histolytica*: su ciclo biológico y la capacidad que estos parásitos tienen para evadir la respuesta inmune.<sup>9</sup>

Es muy importante considerar el ciclo biológico completo del agente causal, como está sucediendo con el desarrollo de la vacuna contra la malaria<sup>11</sup> porque de esta manera se incrementa la posibilidad de identificar un mayor número de antígenos capa-

ces de despertar un respuesta inmune protectora y el número de oportunidades para interrumpir dicho ciclo. Los agentes causales de la malaria son varias especies de *Plasmodium*, cuyos ciclos biológicos<sup>12</sup> son mucho más complejos que el de *E. histolytica*. El ciclo biológico de *E. histolytica* consta solo de dos fases, una trófica, invasora y causante de la destrucción de tejidos (el trofozoíto) y otra infectiva, el quiste. El trofozoíto ha sido intensamente estudiado, pero la Biología Celular y Molecular de los quistes es prácticamente desconocida, fundamentalmente por la falta de un medio de enquistamiento masivo en condiciones axénicas para *E. histolytica*. Sin embargo se han hecho algunos avances en este sentido. En 1980 desarrollamos un medio eficiente, confiable y que además permite que las amibas inicien espontáneamente el enquistamiento en condiciones axénicas, pero con una pared débil.<sup>12</sup> Actualmente hemos desarrollado un nuevo medio donde las amibas forman una pared muy resistente, que contiene quitina y cuyas características morfológicas son prácticamente iguales a las de los quistes naturales. Pero en tanto no se obtenga un pleno éxito en los esfuerzos para producir quistes de *E. histolytica in vitro* todos los esfuerzos para desarrollar vacunas contra *E. histolytica* tendrán que seguirse concentrando en los antígenos de los trofozoítos.

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen un notable habilidad para evadir la respuesta inmune, inmovilizando,<sup>14</sup> degradando anticuerpos anti-antígenos de superficie de las amibas<sup>15</sup> y ejerciendo un efecto inmunosupresor. Esto último en los primeros estadios de la infección.<sup>9</sup> Por lo tanto, las vacunas que se desarrollen tendrán que considerar todas estas características de las amibas para lograr una respuesta inmune eficiente.

Las vacunas contra la amibiasis están en pleno desarrollo y todavía lejos de estar en condiciones de usarse masivamente en beneficio de la humanidad.

Considerando que tanto la respuesta humoral como la celular del sistema inmune son importantes,<sup>9</sup> es posible que la vacuna más efectiva contra la amibiasis tenga también que estimular a ambas ramas del sistema inmune.

Algunos de los trabajos que enseguida citamos presentan sólo los resultados iniciales, que refuerzan la idea de que es posible obtener una respuesta humoral, tanto en la luz intestinal, como en el torrente circulatorio y también una respuesta celular protectora. Algunos otros presentan ya los re-

sultados alentadores con vacunas experimentales en animales. A continuación presentamos algunos ejemplos de todos estos enfoques.

## **Inducción de la respuesta humoral utilizando trofozoítos completos usados como inmunógeno**

### *Trofozoítos completos*

Jain et al. Obtuvieron un cierto grado de protección en cobayos preinoculados con un número relativamente bajo de amibas vía intracecal y luego retados con un inóculo 80 a 100 veces mayor, también por vía intracecal o intramuscular.<sup>16</sup> Otros autores observaron incrementos significativos en los títulos circulantes<sup>17</sup> y coproanticuerpos<sup>18</sup> anti-*E. histolytica* después de inocular animales de laboratorio con trofozoítos fijados con glutaldehído. La respuesta inmune humoral se incrementa notablemente cuando se utiliza la toxina del cólera como adyuvante<sup>18</sup>

### *Transferencia de pasiva de inmunidad mediada por células*

Las células peritoneales de hámsteres inoculados vía intradérmica con amibas vivas son capaces de proteger contra la infección experimental a hámsteres no inmunizados.<sup>19</sup>

### *Protección con anticuerpos monoclonales*

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra un lipofosfoglicano de *E. histolytica* llamado EH5 fue capaz de proteger contra AHA a ratones inmunodeficientes.<sup>20</sup>

## **Antígenos recombinantes**

### *Uso de antígenos pre-diseñados*

MBP/SRHEP-CTA2 (SRHEP-H) es un antígeno que contiene fragmentos de las siguientes 3 proteínas: SRHEP (*Serin rich Entamoeba histolytica protein*), MBP (*maltose binding protein*) y la

subunidad de la toxina del cólera CTA<sub>2</sub>, conocida por su capacidad de incrementar la respuesta inmune hacia otros inmunógenos. Esta vacuna molecular indujo un incremento en la producción de IgA en mucosas y de IgG en suero cuando se administró por vía oral a ratones.

Vacunas anti *E. histolytica* construídas en vehículos moleculares vivos.

Antígenos recombinantes expresados en *Salmonella typhi* atenuada.

Se transformó con un plásmido portador de una secuencia de DNA que codifica para un segmento de GalNac a la cepa SL5928 de *Salmonella Dublin*. GalNac es una lectina localizada en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* que se inhibe en presencia de galactosa/N-acetylglucosamina. Esta lectina juega un papel fundamental en la lisis por contacto que producen las amibas sobre sus células blanco. Cuando se inoculó por vía oral a un grupo de gerbos con estas bacterias se consiguió una disminución hasta de 90% en el tamaño de los abscesos hepáticos en comparación con los testigos no inmunizados.<sup>22</sup>

Zhang T y Stanley Jr. inmunizaron ratones con salmonelas vacunales typhi ( $\Delta cya$ ,  $\Delta crp$ ,  $\Delta asd$ ), las cuales tenían inactivos los genes que codifican para la adenil ciclasa (*cya*) y el receptor del AMP cíclico (*crp*). Esta cepa fue modificada mediante ingeniería genética para que sintetice SREHP/MBP. Los anticuerpos IgG anti-SREHP se incrementaron 10 veces en suero con respecto a los testigos no inmunizados.<sup>23</sup>

#### *Algunas contribuciones de nuestro grupo*

Nosotros hemos dedicado nuestro principal esfuerzo a la identificación y purificación de factores de virulencia de *E. histolytica* y al enquistamiento de este protozoario en condiciones axénicas. Ya antes comentamos la importancia de un método para enquistar masivamente *E. histolytica in vitro*. Enseguida comentaremos algunos de los avances que hemos tenido para identificar, purificar y clonar estos factores, los cuales podrían servir para investigar si estas proteínas amibianas completas o algunos de sus epitopos son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en animales de laboratorio.

#### *Hemolisinas*

Se ha sugerido que la actividad citolítica de *E. histolytica* juega un papel determinante en la habilidad que estos parásitos tienen para destruir a las células blanco. Nosotros encontramos que la actividad hemolítica en extractos libres de células esta relacionada con la virulencia de las cepas<sup>24</sup> Se han identificado varios factores citolíticos de *E. histolytica*, entre ellos una actividad dependiente del potencial de óxido-reducción<sup>25</sup> y fosfolipasas A.<sup>26</sup> También encontramos fosfolipasas A<sub>1</sub> y lisofosfolipasas en la misma fracción subcelular membranal de las amibas.<sup>27</sup> Las fosfolipasas A<sub>1</sub> son también citolíticas en algunas especies de protozoarios parásitos y las lisofosfolipasas inhiben la autodestrucción de las células destruyendo a los liso-derivados que las fosfolipasas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> producen continuamente. Por estas características pensamos que estas tres enzimas son buenos candidatos para producir vacunas, induciendo la producción de anticuerpos contra estos factores de virulencia para inactivarlos y eventualmente despertar una respuesta celular contra las amibas portadoras de estos antígenos. Con esta idea en mente hemos purificado la principal fosfolipasa A<sub>2</sub> de *E. histolytica*, la cual es máxima a pH 8.4, y Ca<sup>2+</sup> 1 mM<sup>28</sup> y clonamos una secuencia de cDNA que codifica para una citolisina dependiente de actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (manuscrito en preparación). El siguiente paso será investigar si estas proteínas son capaces de inducir protección en animales de experimentación.

Por otro lado, investigaremos si los quistes que se forman espontáneamente en nuestro medio de cultivo (PEHPS) son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano en animales de experimentación.

#### Referencias

1. **Iverson AJ.** Why vaccines?. *Nature Med* 1998;4(Suppl. 5):474-476.
2. **Special report.** HIV Dynamics. *Sci Med* 1998;5(2):36-45.
3. **Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Chapter 25.** Marshaling Recombinant DNA to Fight AIDS. En: *Recombinant DNA. Second edition.* New York: Scientific American Books 1998:485-509.

4. **O'Brien SJ, Dean M.** In Search of AIDS-Resistance Genes. *Scientific Am* 1997;277(3):28-35.
5. **Bartlett JG, Moore RD.** Improving HIV Therapy. *Scientific Am* 1998;279(1):64-73.
6. **Baltimore D, Heilman C.** HIV vaccines: Prospects and Challenges. *Scientific Am* 1998;279(1):78-83.
7. **Walsh JA.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228-238.
8. **Clark CG, Diamond LS.** *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of nonpathogenic amebae to the pathogenic form *Exp Parasitol* 1993;77(4):456-460.
9. **Ortiz-Ortiz L.** 5. Amebiasis. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp145-162.
10. **De León A.** Pronóstico tardío para el absceso hepático amibiano. *Arch. De Invest. Med* 1970;1(Supl ):205-206.
11. **Riley EM, Hviid L, Theander G.** 4. Malaria. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp 119-143.
12. **Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Navarro-Marmolejo L, Rodríguez-Pérez E.** *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol. Res.* 1993;79:200-203.
13. **Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora-Galindo J, González-Salazar F y Said-Fernández, S.** Mg, Mn and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cysts-like structures resistant to sodium-dodecyl sulfate. *Arch. Med. Res.* 2000 En prensa
14. **Calderón J, Muñoz M, Acosta HM.** Surface redistribution and release of antibody induced caps in entamebae *J Expt Med* 1980;111:s241-s244.
15. **Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL.** The natural Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and presents its binding. *J Infect Dis* 1998;508-511.
16. **Jain P, Sawhney S, Vinayak VK.** *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1980;74:347-349.
17. **Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC, Enriquez-Rincón F.** The use of ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered *Entamoeba histolytica* antigen in mice. *Arch. Med. Res.* 1994;25:183-187.
18. **Navarro-García F, Pedroso M y López-Revilla R.** Cholera Toxin increases Rat Serum and Mucosal antibody responses Against *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 1997;28: S225-S227.
19. **Ghadirian E, Meerovitch E.** Passive transfer of immunity against hepatic amebiasis in the hamsters by cells. *Parasite Immunol* 1983;5:369-376.
20. **Marinets, A., Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B., Vollman U, Otto Scheiner, Wiedermann G., Stanley Jr. L and Duchene M.** Protection against invasive amebiasis by single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exptl Med* 1997;186:1557-1565.
21. **Sultan F, Jin L-L, Jobling MG, Holmes RK and Stanley Jr. SL.** Mucosal Immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A<sub>2</sub> domain of cholera toxin. *Infect Immun* 1998;66:462-468.
22. **Mann BJ, Burkholder BV, Lockhart AL.** Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 1997;15:659-663.
23. **Zhang T., Stanley Jr. SL.** Progress in an oral vaccine for amebiasis. Expression of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 4297 ( cya crp ansd):safety and immunogenicity in mice. *Arch Med Res* 1997;28:s269-s271.
24. **López-Revilla R, Said-Fernández S.** Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: Hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:209-212.
25. **Castro-Garza JE, Said-Fernández S.** Immediate cell membrane damage produced by *Entamoeba histolytica* subcellular extracts. *Arch Med Res* 1992;23:191-192.
26. **Said-Fernández S, López-Revilla R.** Free Fatty Acid Released from Phospholipids are the major heat-Stable Hemolytic Factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immu.* 1988;56:874-879.
27. **Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S.** Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and Lysophospholipase L1 activities. *Parasitol Res* 1995;81:320-323.
28. **Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodríguez A, Mata-Cárdenas BD, Martínez-Rodríguez HG, Said-Fernández S, Alagón-Cano A.** Isolation of an *Entamoeba histolytica* Intracellular Alkaline Phospholipase A<sub>2</sub>. *Parasitol. Res.* 1998;84:310-314.