



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Evaluación del efecto terapéutico generado por la vacunación con la proteína
rLmxMBA y con el gen que la codifica en un modelo murino de leishmanias
cutánea localizada

TESIS

Que presenta

MARÍA ANGÉLICA BURGOS REYES

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. José Luis Rosales Encina

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Luis Rosales Encina, en el laboratorio de biología molecular del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, y bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana y de el Dr. Marco Antonio Vega López

Durante la realización de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

ÍNDICE

CONTENIDO	Pag.
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES DEL PARÁSITO	
2.1. Taxonomía	2
2.2. Morfología	2
2.3. Ciclo de vida	3
3. LEISHMANIASIS	
3.1. Vector	5
3.2. Formas clínicas de la enfermedad	6
3.3. Epidemiología	8
3.4. Tratamiento	9
4. RESPUESTA INMUNE	11
5. VACUNAS	
5.1. Vacunas de primera generación	14
5.2. Vacunas de segunda generación	14
5.3. Vacunas de tercera generación	15
5.4. Antígenos reversos	17
6. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS	
6.1. Proteosoma	18
6.2. Inmunoproteosoma	19
7. ANTECEDENTES	21
8. JUSTIFICACIÓN	24

9. OBJETIVOS	25
9.1. Objetivo general	
9.2. Objetivos específicos	
10. MATERIALES Y MÉTODOS	26
10.1. Material biológico.	
10.2. Amplificación y clonación del gen <i>LmxMBA</i> a partir de DNA genómico de <i>Leishmania mexicana</i> en el plásmido pVAX1.	
10.3. Expresión de la proteína <i>LmxMBA</i> en células transfectadas	
10.4. Clonación y purificación de la proteína recombinante	
10.5. Electroforesis e inmunotransferencia	
10.6. Localización subcelular de la proteína nativa	
10.7. Esquema de inmunización	
10.8. Efecto terapéutico de la vacuna de DNA en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> .	
10.9. Determinación de anticuerpos por ELISA	
11.RESULTADOS	41
11.1 Amplificación y clonación del gen <i>LmxMBA</i> a partir de ADN genómico de <i>Leishmania mexicana</i> en el plásmido pVAX1.	
11.2 Expresión de la proteína <i>LmxMBA</i> en células eucariotas.	
11.3 Expresión y purificación de la proteína recombinante.	
11.4 Determinación de anticuerpos obtenidos con inmunización con DNA y proteína.	
11.5 Localización subcelular de las proteínas nativas.	
11.6 Efecto terapéutico de la vacuna de ADN y proteína en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> .	
12.DISCUSIÓN	64
13. CONCLUSIONES	67
14.PERSPECTIVAS	68

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios del genero *Leishmania*. A la fecha se han desarrollado diversas vacunas contra la leishmaniasis, sin embargo, aún no se cuenta con una vacuna 100% efectiva contra esta enfermedad.

Basados en el enfoque de vacunología reversa, en el presente trabajo se seleccionó el gen *LmxMBA* como posible candidato a vacuna. Para este fin se evaluó el efecto terapéutico generado por la vacunación con ADN y con la proteína recombinante en un modelo murino de leishmanias cutánea localizada,

Células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* expresan tanto el gen como la proteína, detectados por RT-PCR e inmunotransferencia con oligonucleótidos específicos y anticuerpos anti-r*LmxMBA* respectivamente.

Anticuerpos producidos por ratones BALB/c inmunizados con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* o con la proteína recombinante *rLmxMBA* fueron capaces de reconocer a la proteína nativa en la membrana plasmática de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. El reconocimiento de los anticuerpos generados por la vacunación con la proteína recombinante fue menor al presentado por los anticuerpos generados por la vacunación con ADN.

En cuanto al efecto terapéutico generado por la vacunación con ADN en ratones previamente infectados en cojinete plantar con *L. mexicana*, se evidenció un control de la infección en los ratones vacunados con ADN, observándose disminución de la lesión a los 45 días post-vacunación, mientras que en los ratones vacunados con la proteína recombinante, el tamaño de la lesión continuó aumentando ligeramente hasta el último día evaluado (día 30 post-vacunación).

En conclusión, los resultados aquí presentados apoyan la inmunización con ADN como estrategia para el diseño de vacunas anti-*L. mexicana*.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected infectious disease caused by the protozoan parasite *Leishmania spp.* Although it is considered by the World Health Organization (WHO) as a serious global public health problem, actually there is no vaccine with a hundred percent of effectiveness.

Based on the technology of reverse vaccinology, in the present research, the gene *LmxMBA* was selected as a candidate against leishmaniasis. For this aim, we tested the therapeutic effect of the vaccination with DNA and its correspondent recombinant protein in a murine model of localized cutaneous leishmaniasis.

To demonstrate that this gene was able to be transcribed and translated by the eukaryotic machinery, HeLa cells were transfected with the pVAX1::*LmxMBA* plasmid observing both the mRNA and protein expression by RT-PCR and Western Blot, respectively.

To generate antibodies against the protein, two groups of BALB/c mice were immunized with 1) the pVAX1::*LmxMBA* plasmid and 2) the recombinant protein r*LmxMBA*. Both groups generated antibodies capable to recognize the native protein present in the plasmatic membrane of promastigotes and amastigotes of *L. mexicana*. It should be noted that the recognition of the antibodies was lower in the case of the vaccination with the recombinant protein in comparison with the one obtained with the DNA vaccine.

With respect to the therapeutic effect of the vaccination in mice previously infected with *L. mexicana* in the footpad, a decrease in the size of the infected zone was observed 45 days post-DNA vaccination. In those mice which were vaccinated with the recombinant protein, the size of the infected injury continued growing slightly at least until the last evaluated day (30 days post-vaccination).

In conclusion, our results support the effectiveness of DNA vaccines as a promising strategy against *L. mexicana* infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	6
Figura 2. Estructura del proteosoma constitutivo e inmunoproteosoma.	22
Figura 3. Mapa del vector pVAX1.	27
Figura 4. Predicción de hélices transmembranales.	42
Figura 5. Predicción de epítomos para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos.	42
Figura 6. Amplificación y clonación del gen <i>LmxMBA</i> en el vector pCR4-TOPO.	44
Figura 7. Subclonación del fragmento <i>LmxMBA</i> en el vector pVAX1.	45
Figura 8. RT-PCR e inmunotransferencia de la proteína <i>LmxMBA</i> expresada en células HeLa transfectadas con el plásmido.	47
Figura 9. Purificación de la proteína recombinante <i>LmxMBA</i> .	48
Figura 10. Determinación de anticuerpos anti- <i>LmxMB</i> en ratones inmunizados.	50
Figura 11. Determinación de anticuerpos anti- <i>LmxMBA</i> por ELISA.	52
Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta de promastigotes de <i>L. mexicana</i> no permeabilizados.	54
Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta de amastigotes de <i>L. mexicana</i> no permeabilizados.	55
Figura 14. Inmunofluorescencia indirecta de promastigotes de <i>L. mexicana</i> permeabilizados.	56
Figura 15. Inmunofluorescencia indirecta de amastigotes de <i>L. mexicana</i> permeabilizados.	57

Figura 16. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> .	60
Figura 17. Desarrollo macroscópico de la lesión después de la vacunación con DNA.	61
Figura 18. Efecto terapéutico de la vacuna de proteína recombinante en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> .	62
Figura 19. Desarrollo macroscópico de la lesión después de la vacunación con la proteína recombinante.	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antígenos de <i>Leishmania</i> probados como candidatos a vacunas de DNA.	17
Tabla 2. Diseño de “primers”	28
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos <i>LmxMBA</i>	29

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Se transmite a los humanos por picadura de flebótomos hembra, del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo.

La leishmaniasis tiene 4 formas clínicas de presentación, leishmaniasis cutánea, visceral, mucocutánea y difusa. Según la OMS, se estiman aproximadamente 300 000 casos de leishmaniasis visceral y alrededor de 20 000 muertes anuales. En cuanto a la leishmaniasis cutánea, durante el periodo 2007 - 2012 se habrían reportado un total de 1 millón de casos.¹

Los tratamientos actuales contra esta enfermedad son insuficientes y consisten principalmente de quimioterapia altamente tóxica. Además, los tratamientos se ven obstaculizados en gran medida por el costo de los medicamentos y la aparición de resistencia a los fármacos antileishmania. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna que pueda prevenir la aparición y reducir la propagación de la enfermedad es una prioridad en este campo.

2. GENERALIDADES DEL PARÁSITO

2.1. Taxonomía

El género *Leishmania* sp. pertenece al subphylum *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, de acuerdo a la taxonomía tradicional. *Leishmania* comprende más de 20 especies y se divide en 2 subgéneros, de acuerdo al sitio de desarrollo del parásito en el insecto transmisor: *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)*: *Leishmania*, que se encuentra en el Nuevo (América) y el Viejo Mundo (Europa, Asia y África); y *Viannia*, endémica sólo en el Viejo mundo.²⁻⁴

Cada subgénero se divide en complejos. En el subgénero *Viannia* existen dos complejos: *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. En el complejo de *L. braziliensis*, se encuentran las siguientes especies: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiense*, *L. lainsoni*, *L. shawi* y *L. naiffi*. En el complejo de la *L. guyanensis* se encuentran: *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Además, en el subgénero *Viannia* existen dos especies híbridas: *L. braziliensis/L. panamensis* y *L. braziliensis/L. guyanensis*. En el subgénero *Leishmania* se encuentran cinco complejos: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. donovani* y *L. mexicana*. Los complejos de *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* están formados por una sola especie que le da nombre a su respectivo complejo. El complejo *L. donovani* está formado por 3 especies: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. El complejo *L. mexicana* está formado por *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi*.^{4, 5}

2.2. Morfología

Leishmania es un protozoo intracelular obligado dimórfico; las dos formas o estadios de desarrollo en su ciclo biológico de vida son el promastigote y el amastigote.

El promastigote tiene forma fusiforme o alargada. Mide 10 - 20 µm, sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 µm. Este pasa por

una fase procíclica que es donde crece y se multiplica y no es infectivo, esta forma debe pre adaptarse para poder sobrevivir en el mamífero, mediante la expresión de moléculas de superficie específicas de su estadio.⁶ La otra fase es la metacíclica, ésta se desarrolla en el intestino medio, el tórax y la probóscide de la mosca de la arena, es la fase infectiva del parásito. El promastigote presenta un núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1 - 2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo.⁷

El amastigote, tiene forma redondeada u ovalada, carece de flagelos y de membrana ondulante, por lo cual es inmóvil. Reside y se multiplica en los fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel.⁸ Mide 2 - 4 μm ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une el cinetoplasto y el cuerpo basal, éste último apenas un punto visible.

El cinetoplasto es una estructura mitocondrial especializada, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. La presencia del cinetoplasto da el nombre al grupo de protozoos incluidos en el orden *Kinetoplastida*.⁸

2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse e ingiere macrófagos infectados con amastigotes. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie de vector y de

Leishmania. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe.⁹

Cuando el vector infectado pica a un huésped le inyecta entre 10 y 100 promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide y éstos penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene una función importante en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados.⁹⁻¹² En los vectores excesivamente infectados, la probóscide está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que el mosquito realiza múltiples picaduras e inoculaciones. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, algunos se transforman en amastigotes en las células del sistema fagocítico mononuclear; en los fagolisosomas (vacuola parasitófora), pierden el flagelo y se transforman en amastigotes.¹⁰

Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas de los macrófagos. Primero, inician la división del cinetoplasto. Luego, sigue la división del núcleo por mitosis y concluye con la del citoplasma, en sentido anteroposterior. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que ocasiona la distensión y ruptura del macrófago. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocítico mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un huésped para alimentarse de sangre.¹² (Fig. 1)

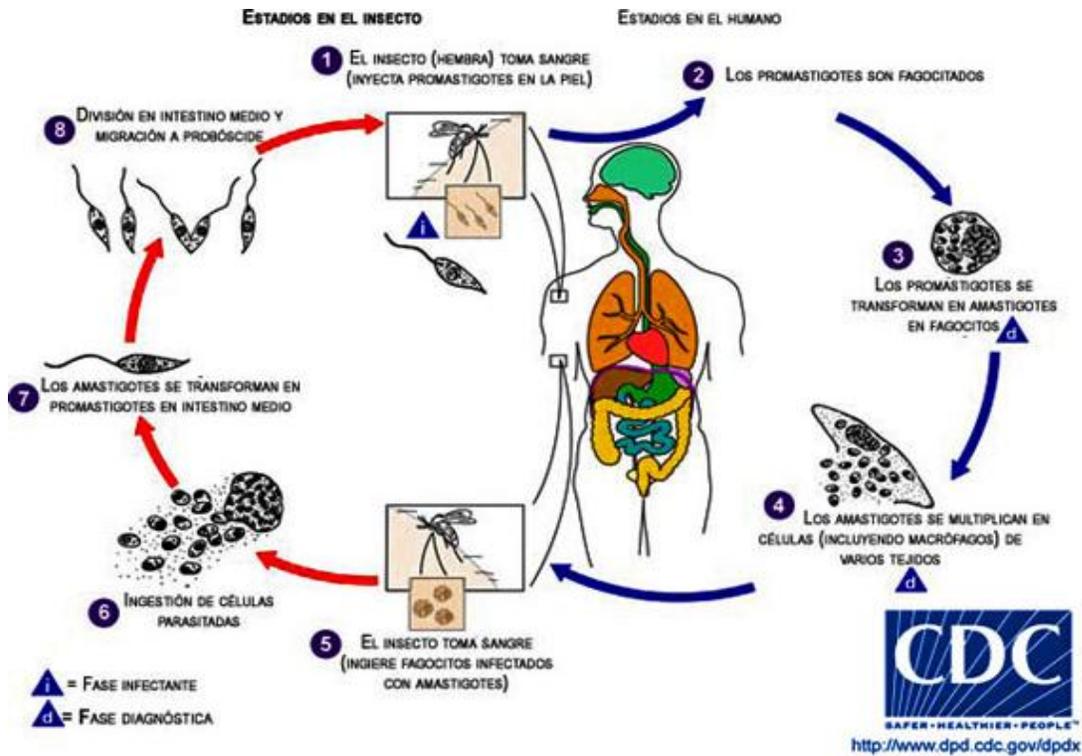


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

3. LEISHMANIASIS

3.1. Vector

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de flebótomos, pequeñas moscas que abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano, en las zonas templadas. Se conocen cinco géneros de flebótomos principales: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, *Sergentomya*, *Warileya* y *Brumptomya*, de los cuales sólo dos se reconocen como vectores de la leishmania: En el viejo mundo (Europa, Asia y África), el género *Phlebotomus*, y en América, el género *Lutzomyia*.¹³

La *Lutzomyia* es un mosquito pequeño, de 1.5 a 3 mm de tamaño, su cuerpo está cubierto de pelos y tiene las alas erectas en forma de 'V'. Su forma de vuelo es muy particular, a manera de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso. El área de su vuelo puede abarcar hasta 200 metros de donde se cría; sin embargo, puede ser transportado por el viento a distancias mayores. Por lo

general, son de aparición vespertina entre las 18 y 20 horas y desaparecen progresivamente hacia la noche. Las hembras son las únicas hematófagas y más activas a la caída del día.¹⁴⁻¹⁷

Los vectores de *Leishmania* pueden habitar en áreas desérticas, en la floresta y en áreas peridomésticas. La mayoría de las especies de flebótomos pican al aire libre desde el atardecer hasta el amanecer aunque hay algunas especies que pican en el interior y en la luz del día, comportamiento que afecta el uso de insecticidas como métodos de control. Los mosquitos infectados con *Leishmania* tienden a sondear varias veces en el mismo hospedero, un método de adaptación que aumenta la transmisión.¹⁸⁻²⁰

3.2. Formas clínicas de la enfermedad

3.2.1. Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea es la forma más común de la enfermedad. Por lo general produce úlceras en las partes expuestas del cuerpo, en cara, brazos y piernas. Puede haber un gran número de lesiones - a veces hasta 200 - que causan incapacidad grave.²¹

La lesión inicial es una pápula que evoluciona a un nódulo eritematoso, pruriginoso e indoloro, acompañada hasta en un 30% de los casos de adenopatía regional, con un diámetro de 1 - 10 cm y que se ulcera en un lapso de 1 - 3 meses. La úlcera característica es redondeada, de borde elevado y bien definido, indurado, cubierta por una costra amarillenta; cuando ésta se desprende revela un fondo de tejido de granulación limpio. Con alguna frecuencia existe infección secundaria, con lesiones purulentas y dolorosas. El cuadro tiende a curar espontáneamente a corto o largo plazo, dejando como secuela una cicatriz visible.

Cuando afecta pabellones auriculares produce una úlcera crónica, progresiva, de fondo exudativo, generalmente indolora, que puede ser mutilante si no se ofrece el tratamiento adecuado.^{21, 22}

3.2.2. Leishmaniasis mucocutánea

En la leishmaniasis mucocutánea, las lesiones pueden conducir a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y las cavidades de la garganta y los tejidos circundantes. Esta es la forma más destructiva de la enfermedad.²¹

Las manifestaciones clínicas se presentan meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea; se deben a metástasis de lesiones cutáneas, aunque en un porcentaje de los casos no es posible identificar la lesión primaria. Las lesiones se inician principalmente en mucosa nasal, simulando en el inicio una rinitis. Se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico. Puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar, deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia.²¹⁻²³

3.2.3. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral, también conocida como kala-azar, se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, inflamación del bazo y el hígado, y anemia.²¹

En países en desarrollo, los niños con algún grado de desnutrición y las personas VIH positivos son la población en mayor riesgo de adquirir la enfermedad progresiva. El tiempo de incubación es de meses, a veces años. Cuando se manifiesta la enfermedad, es grave, y la mortalidad sin tratamiento es del 100%.^{21,}
²²

Los signos y síntomas en niños son fiebre, palidez, anorexia, pérdida de peso, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis; esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatías, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades. En etapas posteriores

del padecimiento se han descrito taquicardia, ictericia, distensión abdominal, ascitis o edema pedal, sangrados y equimosis.

3.3.4. Leishmaniasis cutánea post-kala-azar

La leishmaniasis cutánea post-kala-azar (PKDL) es una complicación de la leishmaniasis visceral (LV) en las zonas donde *Leishmania donovani* es endémica. Se caracteriza por una mácula hipopigmentada, maculopapular, y erupción nodular generalmente en pacientes que se han recuperado de la LV. Suele aparecer 6 meses a 1 año o más después de la curación aparente de la enfermedad, pero puede ocurrir antes o incluso al mismo tiempo que la leishmaniasis visceral en especial en el Sudán.²¹

PKDL cura espontáneamente en la mayoría de los casos en África, pero rara vez en pacientes en la India. Se considera que tiene un papel importante en el mantenimiento y contribución a la transmisión de la enfermedad en particular en períodos interepidémicos de VL, actuando como un depósito para los parásitos.²¹

3.3. Epidemiología

La leishmaniasis humana es endémica a nivel mundial en 98 países y 3 territorios, con la excepción de Australia y la Antártida. El número de casos real de la enfermedad es desconocido debido a la falta de notificación a los sistemas de vigilancia epidemiológica, razón por la cual la mayoría de los datos de incidencia disponibles están basados en estimaciones.²

El número de casos de leishmaniasis visceral (VL) a nivel mundial se calcula entre 0.2 - 0.4 millones de casos por año, de los cuales más del 90% de los casos se presentan en seis países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil.¹³ Los agentes etiológicos pertenecen al complejo *L. donovani*. Se estiman unos 400 000 casos nuevos/año, y se considera que 1 de cada 10 pacientes fallece debido a la enfermedad.¹⁵

En México, los estados en los cuales se han detectado casos de LV son Chiapas, Puebla y Guerrero (la cuenca del Balsas). Los reportes de LV corresponden a *L. chagasi*, principalmente en Chiapas y Guerrero, y se identificó *L. mexicana* en pacientes inmunocomprometidos en Tabasco.^{18, 19}

La leishmaniasis cutánea es la forma de la infección con mayor distribución a nivel mundial. Un tercio de los casos ocurre en cada una de las siguientes regiones epidemiológicas: Las Américas, el Mediterráneo, y en Asia, desde el Medio Este hasta Asia Central. Los diez países que reportan la mayor cantidad de casos son: Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Iran, Siria, Etiopía, Sudán del norte, Costa Rica y Perú, con un estimado del 70- 75% global.¹⁵

Se estima que 0.7 - 1.2 millones de casos de leishmaniasis cutánea (CL) se producen principalmente en el Mediterráneo, América y Asia occidental con cada región contribuye a aproximadamente 30% de los casos, aunque hasta el 75% de estos casos se encuentran en Brasil, Siria y Afganistán.¹⁶

Los principales agentes causales de la CL en América son *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Existen casos autóctonos en Texas, EUA, y se considera endémica en toda Latinoamérica, hasta el norte de Argentina, con las excepciones de Chile y Uruguay. En México, las principales zonas endémicas se encuentran en: Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz.¹⁸⁻²⁰

En cuanto a la leishmaniasis mucosa (ML), se estiman alrededor de 35,000 casos anualmente principalmente en Brasil, Perú y Bolivia.^{17, 20}

3.4. Tratamiento

Todos los tratamientos convencionales implican un elevado costo, falta de efectividad en muchos casos, resistencias y diversos efectos secundarios debido a la alta toxicidad de los medicamentos. En una gran proporción de casos, el tratamiento de las leishmaniasis cutánea y mucocutánea considera a los antimoniales pentavalentes: antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostam).²² Otros fármacos sistémicos utilizados son: Anfotericina B, Anfotericina B liposomal (AmBisome), Anfotericina B desoxicolato, y pentamidina, esta última de empleo muy restringido debido a su toxicidad.²⁵

Los medicamentos antimoniales pentavalentes se administran por vía parenteral (intramuscular o intravenosa), poseen una tasa rápida de absorción, su excreción se realiza a través de la orina, se distribuyen en altas concentraciones en el bazo, hígado y plasma; en el mercado se encuentran dos presentaciones que son el estibogluconato de sodio o Pentostam (Pentostam® Glaxo-SmithKline R.U). y el antimoniato de meglumina o Glucantime (Glucantime® Rhône-Poulenc Rorer, Francia). Los efectos adversos son mialgias y artralgias, dolor de cabeza, anorexia, náuseas, letargo y fiebre; está contraindicado en mujeres embarazados, pacientes con problemas hepáticos cardiacos y renales.^{25,26}

En la segunda línea de tratamiento antileishmania, se encuentra principalmente el fármaco anfotericina B, que se administra por vía intravenosa, actúa alterando la permeabilidad y la membrana celular del parásito al unirse a grupos esteroides como el ergosterol y formando poros en ella, lo cual conduce a un aumento en la salida de potasio intracelular, aminoácidos y purinas, además, potencia la cascada de iones del oxígeno del macrófago, aumentando el efecto leishmanicida. A pesar de que es un medicamento efectivo, posee varios efectos adversos y secundarios como anorexia, tromboflebotomía local, náuseas, vómito, fiebre, hipocalcemia refractaria, nefropatías, miocarditis y en casos severos la muerte.²⁷

Otros fármacos se han probado como drogas alternativas al tratamiento de las Leishmaniasis, entre los que se encuentran la paromomicina, miltefosina, azitromicina, dapsona, rifampicina y doxiciclina, los cuales han mostrado

resultados controvertidos, dando buenos resultados en algunos lugares y siendo insuficientes en otros.²⁵

4. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* inicia desde el momento de la picadura del vector. Inmediatamente, el sistema inmune innato interviene mediante la activación del complemento, la liberación de citocinas que producen vasoconstricción en los vasos sanguíneos lacerados por la picadura del insecto, y la llegada de macrófagos residentes y de neutrófilos sanguíneos al sitio de la lesión.³⁰ Esto podría limitar la capacidad del insecto para alimentarse y para transmitir la leishmaniasis. Sin embargo, la saliva del insecto contiene sustancias vasodilatadoras: maxadilán (*Lutzomyia*) o adenosina (*Phlebotomus*), antiagregantes plaquetarios, y sustancias estimuladoras de la producción de prostaglandina E2 (PGE2), lo cual reduce la inflamación y facilita la transmisión del parásito. De hecho, en un estudio se demostró que las lesiones de ratones inoculados con promastigotes de *L. major* y saliva de flebótomo crecieron más grandes y más rápido que las lesiones de ratones inoculados exclusivamente con promastigotes de *L. major*.⁹

Una vez inoculados los promastigotes en el hospedero, se da la activación de la cascada del complemento que lisa aproximadamente al 90 % de los promastigotes metacíclicos inyectados; sin embargo, hay un 10 % que sobrevive. El parásito contiene cinasas que fosforilan a C3, C5 y C9 provocando su inactivación. Moléculas de superficie del parásito como el lipofosfoglicano (LPG) y una glicoproteína de 63kDa (gp63) o leishmanolisina, favorecen la unión de C3bi a la superficie del parásito y de esta manera, su propia opsonización y posterior fagocitosis mediada por los receptores de complemento (CR) por los macrofagos. A su vez, la activación de complemento ha favorecido la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a que son potentes agentes quimiotácticos para neutrófilos (PMN) y monocitos. *In vitro* se ha demostrado que *L. major* secreta un factor que

es quimiotáctico para PMN denominado factor quimiotáctico de *Leishmania* (LCF).^{28, 29, 31}

Los macrófagos residentes en el sitio de inoculación de los parásitos son las primeras células del huésped en infectarse. Estos fagocitan los parásitos que resistieron la lisis por complemento mediante el receptor CD11b/CD18 y mediante el receptor de manosa que se une a los residuos de manosa del LPG.^{32, 33} El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva y favorecer la fagocitosis a través del receptor de dicha proteína, sin embargo, este mecanismo no provoca la activación del macrófago.³² Una vez en el interior del macrófago, los parásitos se transforman en amastigotes, inhiben además la producción de IL-12 por el macrófago y se dividen activamente.³³

Después de unas horas, los PMN llegan al sitio de la infección. Normalmente, los PMN tienen un período de vida corto y mueren rápidamente por apoptosis; sin embargo, el parásito es capaz de retrasar la apoptosis incluso hasta varios días lo que favorece la invasión y la persistencia del parásito en las células infectadas.³⁴

La llegada de las células dendríticas al sitio de inflamación marca el inicio de la respuesta adaptativa a la infección por *Leishmania*. Este evento se ha relacionado con el aumento de las concentraciones de IL-12, la migración de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ al compartimiento cutáneo, la muerte del parásito y la involución de la lesión clínica.^{33, 35} Las células dendríticas fagocitan los parásitos llevándose a cabo la presentación antigénica. Esta fagocitosis favorece la activación de las células dendríticas y aumenta la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) y de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas son las únicas células con capacidad de procesar el antígeno tanto por la vía del MHC-I como por la vía del MHC-II y por lo tanto, al migrar a los ganglios linfáticos pueden activar a los linfocitos T CD4+ y a los linfocitos T CD8+. En contraste, los macrófagos infectados sólo expresan bajas concentraciones de MHC-II y de moléculas coestimuladoras.³⁶

El progreso de la infección, demostrado en el modelo *Leishmania*-ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th1 o Th2. Una vez en el ganglio, las células dendríticas maduras activan a los linfocitos T y los estimulan para generar una respuesta tipo Th1 mediante la secreción de grandes cantidades de IL-12. Además, la IL-1, IL-23 e IL-27 también contribuyen al desarrollo de la respuesta tipo 1. Los linfocitos Th1 activados migran de regreso a la piel y allí interactúan con los macrófagos infectados. La secreción de IFN- γ por los LTh1 activa a los macrófagos parasitados y los estimula a producir óxido nítrico (NO) mediante la inducción de la sintetasa inducible del NO (iNOS), favoreciendo la muerte de los parásitos intracelulares. Esta activación parece ser dependiente de la interacción entre CD40 y su ligando (CD154). Además, el TNF- α y la IL-12 sinergizan con el IFN- γ para activar a la iNOS.^{30, 37}

Por el contrario, si se induce una respuesta tipo Th2, las citocinas secretadas por los linfocitos Th2 (IL-4, IL-10) activan a la arginasa 1 en los macrófagos con la consecuente degradación de la L-arginina en L-ornitina y urea.³⁹ La L-ornitina es transformada por la ornitina descarboxilasa en putrescina, una poliamina, reduciendo la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO y aumento de la concentración de poliaminas, nutrientes esenciales para el crecimiento intracelular del parásito. Esto quiere decir que la respuesta Th2 no sólo está evitando la muerte del parásito sino que le asegura nutrientes para favorecer su crecimiento.³⁹

5. VACUNAS

Diversos antígenos de *Leishmania* se han explorado como candidato a vacuna para la leishmaniasis. Estos antígenos incluyen parásitos vivos o muertos, parásitos atenuados (primera generación), proteínas recombinantes de *Leishmania* (segunda generación), el ADN que codifica proteínas de *Leishmania* (tercera generación), e inmunomoduladores.⁴⁰⁻⁴³ Actualmente no hay vacuna disponible para el ser humano contra la leishmaniasis, sin embargo, muchos científicos continúan en la búsqueda de una posible vacuna contra la

leishmaniasis.^{42,43} Los principales desafíos en el desarrollo de la vacuna contra la leishmaniasis son la complejidad asociada con la antigenicidad, la respuesta inmune del hospedero, el costo y la eficiencia.⁴²

5.1. Vacunas de primera generación

Los parásitos *Leishmania* muertos y atenuados constituyen la vacuna contra leishmania primera generación. Parásitos atenuados por irradiación con rayos gama, promastigotes knock out para BT1 (biopterin transporter), amastigotes deficientes de SIR2 (silent information regulator 2), parásitos autoclavados administrados con o sin adyuvante, son algunos ejemplos de candidatos a vacuna de primera generación. Aunque las vacunas de primera generación proporcionan un cierto nivel de protección contra la leishmaniasis, desarrollan una respuesta inmune muy variable, así como una toxicidad intolerable. Con el fin de combatir estas limitaciones, se han examinado diversas proteínas de *Leishmania* como antígenos para dilucidar una respuesta inmunológica.^{44,45}

5.2. Vacunas de segunda generación

Las vacunas de segunda generación incluyen proteínas del parásito purificadas, así como proteínas recombinantes de *Leishmania*. Leishmune® es una vacuna de segunda generación, que ha mostrado resultados prometedores en la leishmaniasis visceral canina. Esta vacuna ha sido autorizada en Brasil para proteger perros y de esta manera bloquear la transmisión de la enfermedad a partir de perros a los seres humanos a través de la picadura del mosquito vector. Leishmune® es un ligando fucosa -manosa (FML) –saponina, contiene la fracción purificada FML de promastigotes de *L. donovani* y saponinas como adyuvantes. Se observaron respuestas inmunológicas selectivas en los perros inmunizados con Leishmune® incluyendo cambios fenotípicos tempranos en los neutrófilos y los monocitos, la estimulación selectiva de células T CD8 + con la inducción de respuesta proinflamatoria específica mediada por el interferón- γ .⁴³

Una proteína recombinante de *L. donovani*, rLDp45, también se encontró capaz de evocar la respuesta inmune Th1 protectora, confirmado por aumento del nivel de

expresión de ARNm para IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-12 con una disminución simultánea de la IL-4 y TGF- β , para proteger a los hámsteres de la leishmaniasis visceral inducida experimentalmente.⁴⁶

Varias proteínas excretadas/secretadas de *Leishmania* se han identificado y estudiado como potentes moléculas inmunogénicas. Estas proteínas juegan un papel importante en la virulencia de *Leishmania* debido a su participación activa en la infección y supresión del sistema inmune del huésped. Dado que estas proteínas son importantes en la patogénesis de la leishmaniasis, se espera que podrían ser explotados para la inducción de inmunidad de larga duración contra la leishmaniasis.^{47, 48}

Aparte de la identificación de antígeno adecuado, otros parámetros importantes en el diseño de vacunas contra *Leishmania* son la entrega apropiada del antígeno e inducción de fuertes respuesta inmune tipo Th1 específica contra *Leishmania*. Las vacunas de segunda generación muestran una mejor respuesta en comparación con las vacunas de primera generación. Sin embargo, para aumentar aún más la especificidad y la potencia de la vacunación, están siendo desarrolladas vacunas de tercera generación, DNA que codifica las proteínas del parásito.

5.3. Vacunas de tercera generación

Las vacunas de DNA son las vacunas de tercera generación basadas en preparaciones de plásmidos purificados que contienen transgenes que codifican proteínas antigénicas o péptidos capaces de desencadenar una respuesta inmune contra una amplia gama de enfermedades. Estas vacunas presentan características que confieren ventajas sobre otras tecnologías de vacunas en términos de seguridad, facilidad de fabricación y estabilidad.^{49,50}

Las vacunas de DNA se basan en la administración directa en el huésped de DNA plasmídico que codifica para un antígeno de un patógeno. Estos plásmidos funcionan como un sistema de transporte para el gen, resultando en la producción *in situ* del antígeno. La expresión endógena del antígeno dentro de las células del huésped puede inducir una respuesta inmune completa y duradera. Esta

respuesta incluye anticuerpos, aunque es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas de proteínas recombinantes, así como una activación fuerte y duradera de células T cooperadoras y citotóxicas.⁵⁰⁻⁵³

Las vacunas de DNA pueden inducir la presentación de antígenos a través de las vías tanto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I como del CMH clase II, lo que lleva a la activación de células T cooperadoras CD4+ y citotóxicas CD8+.⁵² Algunos ejemplos de antígenos de *Leishmania* probados como candidatos a vacunas de DNA se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Antígenos de *Leishmania* probados como candidatos a vacunas de DNA.⁶¹

<i>Candidate antigen</i>	<i>Models</i>	<i>Disease</i>	<i>Species</i>
LACK	Dog, mice	VL, CL	<i>L. donovani</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
gp63	Mice, dogs	CL, VL	<i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
KMP11	Mice	CL, VL	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>
CPB	Dogs, mice	VL, CL	<i>L. infantum</i> , <i>L. major</i>
ORFF	Mice	VL	<i>L. donovani</i>
NH 36	Mice	VL, CL	<i>L. chagasi</i> , <i>L. maxicana</i>
TRYP	Dogs	VL	<i>L. infantum</i>
PSA-2	Mice	CL	<i>L. major</i>

Abbreviations: CPB, cysteine proteinase B; CL, cutaneous leishmaniasis; gp63, glycoprotein 63; KMP11, kinetoplastid membrane protein-11; LACK, *Leishmania*-activated C kinase; NH36, nucleoside hydrolase 36; ORFF, open reading frame F; PSA-2, promastigote surface antigen 2; TRYP, trypanredoxin peroxidase; VL, visceral leishmaniasis.

La vacuna de DNA basada en la proteína de membrana Kinetoplastid -11 (KMP11) de *L. donovani* confirió inmunidad contra cepas de *Leishmania* tanto sensibles como resistentes a antimonio en hámsteres dorados. Este estudio confirmó que el antígeno KMP11, podría servir como prometedor candidato a vacuna contra la leishmaniasis por el procesamiento y presentación de antígeno a través de la vía de MHC-1.^{65, 66}

5.4. Antígenos reversos

Consiste en un abordaje inmunológico que considera costo y eficiencia:

- Análisis de datos mediante algoritmos bioinformáticos
- Métodos moleculares para la identificación de transcritos específicos (del patógeno de interés)
- Predicción y determinación de los sitios de corte por el proteosoma
- Predicción de péptidos con capacidad de unión a las moléculas del complejo MHC
- Validación experimental
 - Ensayos *in vitro* e *in vivo* del potencia inmunogénico de los péptidos antigénicos seleccionados
 - Selección de clonas de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno
 - Ensayos funcionales de reconocimiento del patógeno

El número creciente de bases de datos genómicos, proteómicos, transcriptómicos y de genómica comparativa, proporciona la base para estudios encaminados a la identificación de genes que codifican antígenos protectores putativos como nuevos blancos para el diseño de vacunas contra bacterias, hongos y parásitos. Esto podría transformar la disciplina puramente experimental de descubrir antígenos, en una predominantemente teórica y predictiva.

Los avances computacionales y de bioinformática han mediado la transición del estudio de un solo gene (proteína) al estudio del genoma completo permitiendo seleccionar proteínas de interés bajo los criterios que se consideren necesarios e importantes para desencadenar una respuesta inmune protectora frente a determinada enfermedad.⁶⁷ La vacunología reversa iniciada por Rappuoli comprende el análisis *in silico* del genoma para identificar los genes que codifican proteínas con características asociadas con inducción de inmunidad, y la evaluación sistemática de estas proteínas con respecto a su inmunogenicidad.⁶⁸ Empleando el enfoque de vacunología reversa, en el laboratorio se han seleccionado tres proteínas membranales para su posterior caracterización como

antígenos vacunales: LmxEXR, (receptor putativo), LmxMBA (fosfatasa ácida) y LmxHIP (proteína hipotética).

En el presente proyecto se seleccionó el gen que codifica a la proteína LmxMBA, con el fin de evaluar el efecto terapéutico de la vacunación de ratones BALB/c después de una infección experimental con *L. mexicana*.

6. PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I presentan péptidos derivados de la degradación de proteínas endógenas, ya sea bacterianas, virales, parasitarias o propias. La degradación de las proteínas intracelulares es iniciada por proteólisis de proteínas ubiquitinadas en el citoplasma, estas interactúan con la unidad 19S del proteosoma, la cual se encarga de disociarlas de la ubiquitina, desdoblarlas e insertarlas en la unidad 20S, donde las proteínas propias de la célula o antigénicas son degradadas en fragmentos peptídicos de 4 a 9 o hasta 11 aminoácidos.^{54, 55}

Los péptidos producidos en el citosol son transportados al lumen del retículo endoplásmico (RE), donde se ensamblan a las moléculas CMH clase I. El transporte de los péptidos a través de la membrana exterior del RE involucra un transportador de péptidos (TAP), donde los componentes TAP1 y TAP2 forman un canal que permite la importación del péptido dentro del RE en un proceso dependiente de ATP.⁵⁵

Dentro del RE, la cadena alfa de MHC clase I recién sintetizada por los ribosomas se asocia con la calnexina. La calnexina es substituida por calreticulina al unirse la cadena alfa con la b2-microglobulina. Este complejo se asocia con otras proteínas chaperonas, ERp57 y tapasina. Las moléculas MHC clase I son cargadas con péptidos de 8 a 11 aminoácidos de longitud derivados de proteínas intracelulares hidrolizadas por proteosomas. La molécula de clase I con el péptido cargado pasa

entonces del RE al complejo de Golgi y es transferido a la superficie celular donde interacciona con el linfocito T CD8+. ⁵⁴⁻⁵⁶

Por otra parte, el heterodímero MHC clase II recientemente formado es acompañado por la proteína invariante y previene una asociación prematura por cualquier péptido antigénico a través del CLIP (péptido de la cadena invariante asociado a clase II) en el sitio de unión. Después que Ii es degradado, CLIP es removido por la molécula HLA-DM y un péptido de 25 aminoácidos es colocado en la molécula MHC clase II. Finalmente, en la superficie de células presentadoras de antígenos, las moléculas MHC clase II exhiben péptidos antigénicos a células T CD4+. ⁵⁴

6.1. Proteosoma

Los proteosomas son proteasas complejas que desempeñan un papel crítico en la proteólisis intracelular. Representan la principal maquinaria proteolítica no lisosomal de las células eucariotas y son responsables de la degradación de muchas proteínas reguladoras de vida corta y de proteínas asociada con el retículo endoplásmico. También participan en la generación de péptidos para la presentación de antígenos por la vía de MHC de clase I. ⁵⁶

El proteosoma consiste en una unidad proteolítica central, conocido como proteosoma 20S, y dos subcomplejos moleculares que se encuentran en los extremos, llamados reguladores 19S, y juntos forman una estructura cilíndrica 26S. ^{56, 57}

El proteosoma 20S posee cuatro anillos heteroheptaméricos (cada anillo lo forman siete subunidades), dos internos y dos externos. Los anillos externos están compuestos por 7 subunidades estructurales tipo α , los anillos internos están compuestos por 7 subunidades estructurales y proteolíticas tipo β . La actividad proteolítica del proteosoma esta mediada por las subunidades β 1, β 2 y β 5 (Figura 2). La subunidad β 1 corta las proteínas después de residuos ácidos; la subunidad β 2 corta después de residuos básicos; y la subunidad β 5 corta después de residuos hidrofóbicos. En el humano, las moléculas del MHC clase I acomodan

péptidos con residuos hidrofóbicos (productos del corte mediado por $\beta 5$) y ocasionalmente residuos básicos (productos del corte mediado por $\beta 2$) en su extremo C-terminal. En ratones, las moléculas del MHC clase I, solo acomodan péptidos con residuos hidrofóbicos en C-terminal. Los péptidos con residuos ácidos en C-terminal (productos del corte por $\beta 1$) no funcionan como ligandos para las moléculas del MHC clase I, ni en ratones ni en humanos.⁵⁶

6.2. Inmunoproteosoma en toda la sección anterior utilizaste el término proteosoma.

Cuando las células son estimuladas con citocinas pro-inflamatorias, los proteosomas expresados constitutivamente son reemplazados con inmunoproteosomas, los cuales incrementan la producción de péptidos para presentación en moléculas del MHC clase I.^{57, 58}

El inmunoproteosoma está conformado por subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ (Figura 2). La expresión de las subunidades $\beta 1i$ y $\beta 5i$ son fuerte y sinérgicamente inducidas por citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF α). Dos de las subunidades inducibles, LMP2 y LMP7, están codificadas dentro de la región de genes MHC de clase II cerca de la TAP (transportador asociado con el procesamiento de antígenos) que son necesarios para el transporte de péptidos hacia el lumen del ER, donde se unen a moléculas del MHC de clase I.⁵⁸

Los ligandos para unirse a moléculas del MHC clase I generados por el inmunoproteosoma son distintos y más eficientes en la activación de linfocitos T en comparación a los ligandos generados por el proteosoma constitutivo. Esto se debe en parte, a los cortes generados por las subunidades del inmunoproteosoma, debido a que el reemplazo de $\beta 1$ por $\beta 1i$, resulta en la eliminación de la actividad tipo caspasa (corte después de residuos ácidos) de $\beta 1$ y potencia la actividad tipo quimiotripsina de $\beta 1i$, favoreciendo la generación de péptidos con residuos hidrofóbicos en el extremo c-terminal.⁵⁷⁻⁵⁸

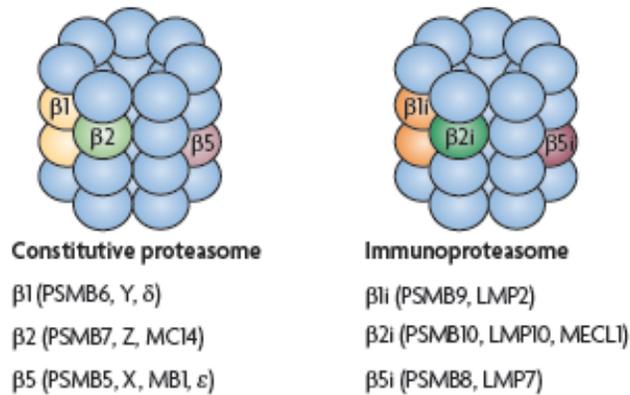


Figura 2. Estructura del proteosoma constitutivo e inmunoproteosoma. ⁵⁷

7. ANTECEDENTES

La localización del inmunoproteosoma se ha investigado usando anticuerpos monoclonales para LMP2 y LMP7. Brooks y cols. (2000) encontraron inmunoproteasomas fuertemente enriquecidos en todo el retículo endoplásmico a juzgar por los experimentos de doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-calreticulina. En este estudio, también se evaluó el efecto del interferón sobre los inmunoproteasomas, observándose un incremento de éstos, pero ningún efecto sobre su distribución. De esta manera, estos resultados proporcionan la evidencia directa de que los inmunoproteasomas están fuertemente enriquecidos en el retículo endoplasmático, donde pueden estar ubicados cerca del transportador TAP para proporcionar eficiente transporte de péptidos en el lumen del retículo endoplásmico para la asociación con moléculas MHC de clase I. ⁶⁰

Los linfocitos T citotóxicos juegan un papel muy importante en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares (virus, bacterias y parásitos) y contra células tumorales. Para activarlos es necesaria la correcta presentación de antígenos por medio de la vía MHC clase I, sin embargo este proceso es poco eficiente ya que se ha reportado que por cada 10^4 proteínas citoplasmáticas que son degradadas por el proteosoma solo entra 1 péptido al retículo endoplásmico (RE) para ser ensamblado en el MHC de clase I. ⁶²

En años recientes, se han desarrollado varias estrategias que superan esta limitación y potencian la respuesta inmune. Una de estas estrategias se basa en el envío de antígenos directamente al RE, esto mediante la fusión a una proteína residente del RE como la calreticulina (CRT). Cuando se fusionó la proteína E7 del virus de papiloma humano a CRT, se observó un incremento en la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos para E7 y un efecto antitumoral contra tumores que expresan E7 cuando ratones se inmunizaron con DNA-CRT/E7 comparado con aquéllos que se inmunizaron con DNA-CRT ó DNA-E7.⁶³ Estos resultados sugieren que la fusión de CRT a un antígeno candidato puede incrementar la respuesta de linfocitos T CD8+ cuando se inmuniza con DNA.

La vía por la cual se generan oligopéptidos que se pudieran utilizar como ligandos para moléculas de MHC de clase I, es el Sistema de Degradación asociado al Retículo Endoplásmico (o ERAD, por sus siglas en inglés, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*). Este sistema se encarga de la degradación de proteínas aberrantes en el retículo endoplásmico. En este sistema, las proteínas mal plegadas son translocadas al citoplasma y posteriormente son degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma. A este respecto se han identificado varias proteínas transmembranales nativas del RE que sirven como sustrato para el ERAD. Estas proteínas incluyen al citocromo P450 CYP3A4, la reductasa de HMG-CoA y la ciclooxygenasa 2 (COX-2), entre otras.⁶⁴

Mbonye y col. (2006), identificaron una secuencia de 19 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína COX-2, la cual puede orientar una proteína al sistema ERAD. En este estudio, se observó que COX-2 es degradada con una vida media de 2 horas y tal degradación es retardada por inhibidores del proteosoma 26S. A diferencia de COX-2, otra isoforma de la proteína, COX-1 no posee dicha secuencia y su expresión es estable (vida media >12 horas). Una delección de 18 aminoácidos en COX-2 y una inserción de los 19 aminoácidos en COX-1 (ins 594-612 COX-1), invierte la estabilidad de estas proteínas mutadas,

resultando en una vida media de ~3 horas para COX-1 y ~24 horas para COX-2. Sin embargo, una mutación de Asn-594, sitio de N-glicosilación estabiliza tanto COX-2 como la ins 594-612 a COX-1. Así, se demostró que para la degradación de COX-2 fue necesaria tanto la presencia de la secuencia de 19 aminoácidos, como el sitio N-glicosilación en su extremo amino terminal.⁵⁹

8. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de amplia distribución geográfica, afecta a 98 países a nivel mundial, más de 12 millones de personas están infectados y 350 millones están en riesgo de adquirir la infección. A la fecha, se han caracterizado varias moléculas del parásito que inducen respuestas inmunes protectoras contra la infección por *Leishmania*, sin embargo, la eficacia de estas vacunas en ningún caso llega al 100%.

Se ha logrado determinar que una respuesta inmune Th1 y activación de linfocitos T CD8⁺ juegan un papel importante en el control de la infección contra *Leishmania spp.* Para activar los linfocitos T CD8⁺ es necesaria la correcta presentación de antígenos por medio de la vía MHC clase I, sin embargo este proceso de generación de péptidos es poco eficiente, pues se ha reportado que por cada 10⁴ proteínas citoplasmáticas que son degradadas por el proteosoma solo un péptido generado entra a retículo endoplásmico (RE) para ser ensamblado en el MHC de clase I.

Basados en los resultados previamente obtenidos con el enfoque de vacunología reversa, se seleccionó el gen *LmxMBA* como posible candidato a vacuna. Por lo anterior, es de interés evaluar y comparar el efecto terapéutico generado por la vacunación con la proteína recombinante rLmxMBA y con el gen que la codifica posterior a una infección experimental de leishmaniasis cutánea localizada en un modelo murino.

9. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar y comparar el efecto terapeutico generado por la vacunaci3n con la prote3na recombinante rLmxMBA y con el gen que la codifica posterior a la infecci3n experimental de leishmaniasis cut3nea lozalizada en un modelo murino.

Objetivos espec3ficos

1. Obtener el pl3smido recombinante que codifica para el ant3geno *LmxMBA*.
2. Demostrar la expresi3n de la prote3na *LmxMBA* en una l3nea de c3lulas eucariotas.
3. Expresar y purificar la prote3na *rLmxMBA*.
4. Determinar la expresi3n estadio espec3fica de la prote3na LmxMBA nativa.
6. Evaluar el efecto terap3utico de la vacuna de DNA y prote3na en ratones infectados con *L. mexicana*.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Material biológico.

10.1.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento: Se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen™) para clonación del gen en el vector pCR®4-TOPO y el vector pVAX1. La cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21 se usó para la clonación del gen en el vector pRSETA (contiene un Tag de histidinas para fusionar y obtener proteínas recombinantes y es inducible con IPTG). Las cepas bacterianas se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB). Cuando se requirió, el medio se suplementó con kanamicina (40 μ g/ml), ampicilina (100 μ g/ml), o cloranfenicol (25 μ g/ml).

10.1.2. Vectores: Los vectores pCR®4-TOPO, pVAX1, pRSETA objeto de clonación y subclonación, fueron adquiridos de Invitrogen.

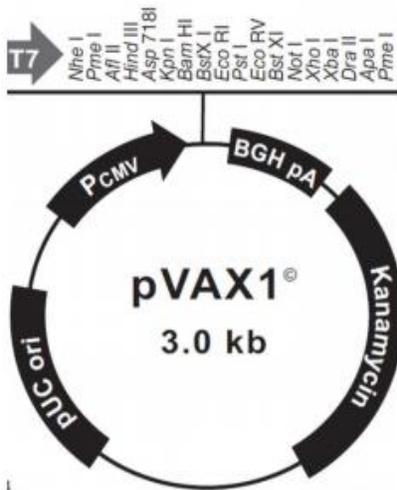


Figura 3. Mapa del vector pVAX1. El vector posee un sitio promotor de citomegalovirus (PCMV), un origen de replicación pUC, una región génica codificante de resistencia a la kanamicina, un sitio de poliadenilación conferido por la secuencia proveniente de la hormona de crecimiento bovina (BGH pA), además de un sitio de clonación múltiple.

10.1.3 Parásitos: Se utilizó una cepa de *Leishmania mexicana* aislada de las lesiones de un paciente con leishmaniasis cutánea.

Cultivo de parásitos: Los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron axenicamente a 28°C en cajas de cultivo de 25 cm², con 10 ml de Medio RPMI-1640 (GIBCO BRL NY USA), pH 7.4, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (100 µl penicilina y 50 mg/ml estreptomina). Cada 8 días se renovaron los cultivos dependiendo del crecimiento del parásito. Estos fueron cultivados y mantenidos a 28 °C hasta que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

10.1.4 Animales de laboratorio: Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 4-6 semanas de edad, obtenidos de la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN (México).

10.2. Amplificación y clonación del gen *LmxMBA* a partir de DNA genómico de *Leishmania mexicana* en el plásmido pVAX1.

Todas las manipulaciones de DNA (PCR, restricciones, ligaciones, clonaciones y subclonaciones) se realizaron mediante técnicas convencionales de biología molecular (Ausubel et al., 1997; Sambrook y Rusell, 2002).

10.2.1. Extracción de DNA de *Leishmania mexicana*:

Se partió de un cultivo de *Leishmania mexicana* aproximadamente de 120 ml, se centrifugó a 4.000 rpm por 20 min a 4 °C, y se desechó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió en 2 ml de PBS 1 X, se centrifugó a 4.000 rpm por 5 min, este paso se realizó dos veces. La pastilla se resuspendió suavemente en 2 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM EDTA pH 8.0, SDS 1%), se agregó 50 µg/ml de RNasa A y se incubó a 37°C por 4 h. Posteriormente se agregó 100 mg/ml de proteinasa K, y se incubó a 42°C durante toda la noche. A la solución anterior se adicionaron volúmenes iguales de Tris-HCl y fenol saturado pH 8.0, se mezcló por inversión suavemente, se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min y se removió la fase acuosa, posteriormente se agregaron volúmenes iguales de

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI) a la fase acuosa, se mezcló por inversión suavemente y centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. A la fase acuosa se agregaron volúmenes iguales de cloroformo/isopropanol, se mezcló suavemente y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. A la fase acuosa de la última extracción se le agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2,0 volúmenes de etanol absoluto y se mezclaron suavemente, se centrifugó a 14.000 rpm por 30 min y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70% y se dejó secar a 40°C. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se almacenó a 4°C. La concentración de DNA se cuantificó mediante espectrofotometría a una D.O. de 260 nm.

10.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes a los antígenos seleccionados a partir de DNA genómico de *Leishmania mexicana*.

Se diseñaron primers específicos que amplifican la región codificadora del gen *LmxMBA* de *Leishmania mexicana* y fueron sintetizados por Sigma- Aldrich. (Tabla 2.)

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *LmxMBA*

PRIMER	SECUENCIA (5'- 3')	Tamaño (pb)
LmxMBAF (Forward)	AAGCTTTCGCCACCATGGACAAGGTGGAGCTGGTGCAG	1337
LmxMBAR (Reverse)	CACGAATTCTTACCCGCCGCTGGACATGGGCGAC	

La reacción de amplificación (PCR) se preparó a partir de 1 µl de DNA genómico de *L. mexicana*. La mezcla de reacción consistió en 2.5 µl de amortiguador 10X Taq contiene 2.0 mM MgCl₂ (Biolabs), 1µl de la mezcla de dGTP, dTTP, dATP, dCTP, 10 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos específicos y 0.5µl de Taq

polimerasa (Biolabs). Las condiciones de la amplificación en un equipo PCR Sprint IP20 (Thermo Scientific) fueron los siguientes:

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del fragmento *LmxMBA*

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	35
Alineamiento	65 °C	30 segundos	35
Elongación	72 °C	1 minuto	35
Elongación final	72°C	7 minutos	1

Los productos de la reacción de PCR se analizaron en geles de agarosa 1%, se visualizaron con bromuro de etidio (BIO-RAD) y fotografiaron en un transiluminador de luz UV. Se utilizaron como marcadores de PCR, fragmentos de 100-1,000 pb Bio-ladder (Bio-Synthesis).

10.2.3 Clonación del gen *LmxMBA* a partir de ADN genómico de *Leishmania mexicana*.

Se realizó la purificación de los fragmentos de DNA amplificados, utilizando el kit QIAEX® II. Consiste en pesar el fragmento de agarosa con la banda deseada, agregar 3 veces el volumen de buffer Qx1, agregar aproximadamente 10 µl de perlas en suspensión QIAEX®, y mezclar y dejar a 55 °C por 10 min. Centrifugar a 14 000 rpm, desechar sobrenadante, lavar con 500 µl de buffer Qx1, centrifugar a 14 000 rpm, desechar sobrenadante, resuspender en buffer PE 500 µl, lavar una segunda vez con buffer PE 500 µl. Empastillar, secar y resuspender en 20 µl de agua estéril a 50°C durante 5 min, centrifugar a 14 000 rpm durante 4 minutos y agregar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

Posteriormente se realizó la clonación del amplicón en el vector pCR®4-TOPO (Invitrogen). Se mezcló 4 µl del producto de interés amplificado y purificado, 1 µl de solución salina y 1 µl del vector pCR4-TOPO. Se incubó a 22°C durante 30 min. Una vez realizada la reacción de ligación pCR4-TOPO::LmxMBA, se realizó el protocolo de transformación en células *E. coli* DH5α con el plásmido. Para ello, a la reacción de ligación pCR4-TOPO::LmxMBA se le adicionó 100 µl de las células *E. coli* DH5α competentes, se incubó en hielo durante 20 min y después se incubaron por 2 min a 42°C ó por 5 min a 37°C. Los tubos se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min, se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 35 min. Los tubos se centrifugaron durante 3 min a 2500 rpm, el sobrenadante resultante se desechó por decantación, las células se resuspendieron en aproximadamente 100 µl de medio sobrante. Las células fueron espatuladas en placas LB/Amp (100 µg/ml de ampicilina), se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se observó crecimiento de colonias transformantes y se realizó PCR colony a partir de las colonias obtenidas. Los productos amplificados se analizaron en un gel 1% de agarosa.

10.2.4. Purificación de ADN plasmídico

Posteriormente se realizó la purificación de DNA plasmídico por el método de Maxiprep. Para esto, se centrifugó el cultivo bacteriano durante 10 min a 14 000 rpm; la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de STE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa 50 mM), posteriormente se adicionaron 3 ml de la solución II (NaOH 2N y SDS al 1% preparada al momento), se mezcló la muestra por inversión y se incubó en hielo 15 min. Se adicionaron 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó en hielo otros 15 min, la solución fue centrifugada a 14 000 rpm por 3 min para separar el debris y el DNA cromosomal, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó un volumen igual de una mezcla fenol-cloroformo (1:1), se mezcló con vortex 1 min y se centrifugó 14 000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el DNA se incubó con 20 µl de RNAsa AT1 a 37°C durante 1 h. Se

agregaron 2 volúmenes de etanol al 95 %, se incubó 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min para precipitar los ácidos nucleicos. Se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%; la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 20 µl de agua estéril. El DNA plasmídico obtenido, se analizó por restricción enzimática utilizando la enzima EcoRI, permitiendo comprobar que el fragmento liberado corresponde al gen de interés ya que el vector de clonación pCR4-TOPO ya está linearizado con esta enzima.

Una vez obtenido este material se procedió a realizar un ensayo de restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (New England Biolabs) para liberar el gen *LmxMBA* clonado en el vector pCR®4-TOPO. Para verificar la restricción enzimática se visualizó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, se observó en el transiluminador de luz u.v y se cortó la banda correspondiente al inserto; posteriormente se realizó la extracción en gel con kit QIAEX® II, según indicaciones anteriormente mencionadas.

10.2.5. Subclonación del gen *LmxMBA* en el plásmido pVAX1

Para realizar la ligación se hizo una mezcla de 6 µl del plásmido pVAX1 linearizado con las enzimas *HindIII* y *BamHI*, 2 µl del inserto de interés purificado por QIAEX® II y 2 µl de Buffer ligasa T4 (Invitrogen), 1 µl de ligasa T4 y 9 µl de agua estéril para un volumen final de 20 µl, se incubó por 3 horas a 22°C.

Una vez realizada la reacción de ligación pVAX1::*LmxMBA*, se realizó el protocolo de transformación en células *E. coli* DH5α con el plásmido, anteriormente mencionado. Las células fueron espatuladas en placas LB con Kanamicina (40 µg/ml), se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se observó crecimiento de colonias transformantes y se realizó PCR colony a partir de las colonias obtenidas para seleccionar las clonas positivas. Se corrió un gel de agarosa 1% para observar las reacciones que amplificaron el fragmento deseado. Posteriormente se realizó purificación de ADN plasmídico por el método de Maxiprep. Para esto, se inoculó una de las colonias positivas en 50 ml de

medio LB – Kanamicina (40 µg/ml), y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante.

Una vez obtenido este material se procedió a realizar un ensayo de restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (New England Biolabs) para liberar el gene *LmxMBA* clonado en el vector pVAX1. Para verificar la restricción enzimática se visualizó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, se observó en el transiluminador de luz u.v.

10.2.6. Reacción de secuenciación.

Se utilizaron tubos de PCR estériles donde se colocaron 1000-500 ng de DNA plasmídico, 8 µl de MIX y 10 pmoles de oligonucleótido T7 para una reacción y el oligonucleótido T3 para la otra, se llevó a 20 µl con agua estéril. Se sometieron al programa: 96 °C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 20 s, 53 °C durante 20 seg y 60°C por 4 min. Posteriormente las columnas se hidrataron para la purificación, se colocaron las muestras y centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min, en ellas se colocan 20 µl de la reacción de PCR, las columnas se centrifugaron a 3000 rpm 2 min, se colectaron y secó la muestra en “speed vac”. Se guardaron a -20 °C y se secuenciaron de forma automatizada utilizando el kit Taq Fluorescence-Based Dye Terminator Cycle Sequencing. Las lecturas de la reacción de secuenciación se obtuvieron con el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E In DNA Sequencer, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-México a cargo de la QFB. María Guadalupe Aguilar González.

10.3. Expresión de la proteína *LmxMBA* en células transfectadas

Células HeLa fueron sembradas en cajas de 25 cm² y al llegar al 70% de confluencia fueron transfectadas con 1µg de DNA plasmídico purificado a través de columnas de intercambio anionico (Invitrogen). Células HeLa se transfectaron con pVAX1 o pVAX1::*LmxMBA* utilizando el producto comercial X-tremeGENE HP

DNA Transfection Reagent, cuya formulación es de lípidos no liposomales y se siguió el protocolo de manufactura.

Las células HeLa se recogieron 48 h pos-transfección y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato tres veces. El RNA total se extrajo con el reactivo Trizol (Invitrogen). El ADN complementario (cDNA) se obtuvo a partir de RNA con el First-Strand Super Script™ Sistema de Síntesis de (Invitrogen). *LmxMBA* cDNA se amplificó por PCR utilizando los “primers” mencionados anteriormente. Los productos amplificados se analizaron en un gel al 1% de agarosa.

Adicionalmente se realizaron extractos totales de las células HeLa transfectadas y no transfectadas para hacer ensayos de inmunotransferencia. Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

10.3.1. Determinación de *LmxMBA* en células transfectadas por RT-PCR

10.3.1.1. Purificación de RNA

El RNA total de las células HeLa transfectadas y sin transfectar fue obtenido con el sistema TRIZOL, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, a las células lavadas con PBS, se les adicionó 1000 µl de TRIZOL y se dio vortex por 1 min, se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 10000 g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las fases acuosas se separaron y fueron transferidas a tubos eppendorf estériles, se adicionaron 250 µl de isopropanol para precipitar y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 10 000 g durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 70-75%. Los tubos se centrifugaron a 8000 g durante 10 min a 4°C, la pastilla se secó en esterilidad y se resuspendió en 5 µl de agua-DEPC. Finalmente, los tubos con el RNA se incubaron a 55°C-60°C.

10.3.1.1. Obtención de cDNA

Aproximadamente 1 µg de RNA se transcribió a cDNA con un oligonucleótido poli (dT), utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II. A un tubo limpio se le adicionó 1 µl de oligo dT y aproximadamente 3 µl de RNA total, las muestras se llevaron a 12 µl con agua-DEPC estéril. Los tubos se calentaron durante 10 min a 70°C y posteriormente se colocaron en hielo rápidamente durante 2 min. Se adicionaron 4 µl del amortiguador de primera cadena 5X, y luego se adicionó 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de la mezcla de dNTP's (10Mm). Los tubos se incubaron durante 2 min a 42°C. Finalmente, se adicionó 1 µl de la enzima (SuperScript II) y se incubó durante 50 min a 42°C. La reacción fue inactivada por 15 min a 70°C. El cDNA se usó como templado para la reacción de PCR.

10.4. Clonación y purificación de la proteína recombinante

Se diseñaron primers específicos que amplifican la región codificadora del gen *LmxMBA*, sintetizados por Sigma-Aldrich. Mediante la técnica de PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes al antígeno LmxMBA a partir de DNA genómico de *Leishmania mexicana*.

Posteriormente el fragmento *LmxMBA* obtenido por restricción fue subclonado en el vector pRSETA, mediante un Kit de ligación rápida, en el cual se usó la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas), la cual lleva a cabo la ligación entre el inserto y el vector; obteniendo así la construcción del plásmido recombinante pRSETA:LmxMBA. Luego se transformaron bacterias *E. coli* BL21.

Una colonia de bacterias *E. coli* BL21 transformada con el plásmido, se inoculó en 50 ml de medio Luria Bertani (LB) conteniendo 50 µg/ml de cloranfenicol y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó en 300 ml de LB/cloranfenicol con 25 ml del cultivo de toda la noche y se incubó a 37°C durante 2 h en agitación constante hasta obtener una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se indujo la expresión de la

proteína con una concentración final de 0.3 mM de isopropil-1-tio- β -D-galactósido (IPTG) incubándose durante 2 h a 37°C en agitación constante. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm por 20 min, llevándose a cabo lavados con 20 ml de PBS 1X. Las células se resuspendieron en 20 ml de Tris-HCl 30 mM, Sacarosa 20%, EDTA 1 mM, pH 8.0, y se incubaron 10 min a temperatura ambiente (T.A.) en agitación constante. Posterior a la incubación, las bacterias se centrifugaron a 8,000 rpm por 20 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Las células obtenidas se resuspendieron en 5 ml de una solución Tris-HCl 20 mM, 0.5 % de NP-40, pH 7.4, junto con ello se adicionarán inhibidores, TLCK 5 mM, IAA 3 mM, NEM 5 mM, leupeptina 1 mM y PMSF 1 mM, 1 mg/ml de lisozima y la muestra se incubó 10 min en hielo. Las muestras se sonicaron 3 veces por 1 min con intervalos de 1 min en hielo y después se centrifugaron a 10 000 rpm en el rotor JA20 por 10 min, se colectó el sobrenadante y se pasó a través de filtros de 0.45 μ m, posteriormente se pasó a una columna Ni-agarosa (Novagen 69670-3) previamente equilibrada con Buffer A (Tris-HCl 20 mM pH 8.5, KCl 100 mM, Imidazol 20 mM, glicerol al 10 %, β Me 10 mM), después de pasar la muestra por la columna, se lavó de forma secuencial con buffer A, buffer B (Tris-HCl 20 mM pH 8.5 con 0.1 % de Tritón X-100), buffer C (Tris-HCl 20 mM pH 8.5, KCl 1 M, glicerol al 10 %, β Me 10 mM), Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas en buffer D (500 mM de Imidazol).

Para comprobar la pureza de forma cualitativa las proteínas recombinantes se analizan en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras visualizadas con tinción de Coomassie.

10.5. Electroforesis e inmunotransferencia

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida al 12% y se corrieron a 200 volts en amortiguador de corrida. Al finalizar la electroforesis, los geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) se tiñeron con azul brillante de coomassie R-250. Después de la tinción los geles se incubaron en solución

desteñidora (ácido acético glacial al 20% y metanol al 80%) hasta que las bandas se vieron claramente.

Para las inmunotransferencias los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 80 Volts por 2 horas con amortiguador de transferencia. La membrana se bloqueó con TBST- leche 2% (Tris 10Mm, NaCl 150 mM, tween 20 al 0.05%) y se incubó con el primer anticuerpo 2 horas en agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. la membrana se lavó 3 veces con TBST (cada lavado de 15 min) y se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina durante una hora a temperatura ambiente. Enseguida se lavó con TBST 3 veces y se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina: BCIP y NBT. La membrana se incubó hasta que las bandas fueron visibles (10 -30 min). Finalmente la membrana se lavó con agua para detener la reacción de la enzima.

10.6. Determinación de anticuerpos por ELISA

Los anticuerpos anti-MBA fueron detectados por ELISA usando placas cubiertas con 5 µg/ml de la proteína recombinante rLmxMBA. Cada pozo fue incubado toda la noche a 4°C, con 50 µl de la proteína disuelta en NaHCO₃ 0.1 M pH 8.5. El antígeno no unido fue removido por lavados con PBS - Tween 20 al %0.05%. Los pozos fueron bloqueados con PBS que contenía leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente. Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína rLmxMBA y con el plásmido pVAX1::MBA y sueros preinmunes se incubaron a una dilución de 1:50 y 1:200 a 4°C toda la noche. Después de 8 lavados con PBS-Tween los pozos fueron incubados con un anticuerpo peroxidado anti-ratón IgG 1 hora a 37°C. Los pozos se lavaron y se agregó el sustrato: 2,2 azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6 sulfuric acid). Se mantuvo en oscuridad y las lecturas se efectuaron 10 minutos después a 405 nm.

10.7. Esquema de inmunización

10.7.1 Inmunización con DNA

Ratones hembras BALB/c (6-8 semanas de edad) fueron divididos en 2 grupos. Se sangraron para obtener suero preinmune y posteriormente fueron inmunizados con el vector pVAX1 (grupo I) o con el plásmido pVAX1::LmxMBA (grupo II). Los ratones se inmunizaron un total de 3 veces por vía intramuscular (una inmunización cada 15 días), con una concentración de 100 µg del plásmido diluidos en 50 µl de PBS (Davis *et al.*, 1993). Al término del esquema de inmunización los animales se sangraron para la obtención de sueros inmunes.

10.7.2 Inmunización con la proteína recombinante

Ratones hembras BALB/c (6-8 semanas de edad) se inmunizaron con dos dosis de 10 µg de la proteína recombinante rLmxMBA por vía intraperitoneal, utilizando el adyuvante comercial Titer-max en relación 1:1. Los ratones se inmunizaron un total de 2 veces (una inmunización cada 15 días), y un mes después de la última inmunización se sangraron para obtener sueros inmunes.

10.8. Protección de la vacuna de DNA y proteína en ratones BALB/c.

Reto de ratones BALB/c con promastigotes de *Leishmania mexicana*

Ratones BALB/c inmunizados con la con la proteína recombinante o con el plásmido pVAX::LmxMBA, se inocularon en el cojinete plantar con 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* en la fase estacionaria resuspendidos en PBS estéril.

El seguimiento de la evolución de la lesión en los ratones se realizó cada 8 días, permitiendo determinar el establecimiento de manifestaciones físicas y el grado de inflamación el cual se determinó mediante la medición de la lesión en el cojinete plantar utilizando un calibrador vernier.

10.9. Efecto terapéutico de la vacuna de DNA en ratones infectados con *L. mexicana*.

Ratones hembras BALB/c (6-8 semanas de edad) fueron divididos en 5 grupos. Se sangraron para obtener suero preinmune y posteriormente se inocularon en el cojinete plantar con 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* en la fase estacionaria resuspendidos en PBS estéril. Se realizó seguimiento de la evolución de la lesión cada 8 días, haciendo medición de la lesión en el cojinete plantar utilizando calibrador vernier. Dos meses después de la infección los ratones fueron tratados: Grupo 1, con el plásmido pVAX1::LmxMBA; Grupo 2, con el vector pVAX1; Grupo 3, con la proteína rLmxMBA+ titer max; Grupo 4, con titer max; Grupo 5, sin tratamiento.

10.10. Localización subcelular de la proteína nativa

Para la determinación de la expresión estadio específico de la proteína nativa, los anticuerpos obtenidos se probaron en ensayos de inmunotransferencia contra extractos de promastigotes y amastigotes, y en ensayos de inmunofluorescencia.

Extractos totales de *Leishmania mexicana*. Para la preparación de los extractos totales de promastigotes se partió de cultivos en crecimiento exponencial, estos fueron lavados dos veces con buffer de fosfatos salinos (PBS) por centrifugación (2000 rpm por 3 minutos). La pastilla obtenida se resuspendió en 50 μ l de amortiguador de muestra (Glicerol 2%, SDS 4 %, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, azul de bromofenol 0.2 %) y β -mercapto 200 mM y se hirvieron por 5 min en baño maría. Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Para la obtención de los amastigotes se siguió el siguiente protocolo: 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* contenidos en medio RMPI 1640, pH 7.2, SFB 10% se lavaron con PBS y se transfirieron a medio RMPI 1640, pH 5.5, SFB al 25%. Se mantuvieron de 3 a 4 días a 37°C en incubadora de CO₂ y se monitoreo la aparición de amastigotes mediante microscopia óptica.

Inmunofluorescencia indirecta. Promastigotes en fase exponencial de crecimiento y amastigotes obtenidos de acuerdo al protocolo anterior fueron recuperados por centrifugación (4000 rpm durante 5 minutos) y fijados a laminillas para su uso en inmunofluorescencias.

Para comprobar la localización subcelular de las proteínas nativas en los diferentes estadios de *L. mexicana*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los 2 estadios del parásito usando los anticuerpos policlonales producidos por la inmunización con la proteína recombinante y por la inmunización con el plásmido pVAX::LmxMBA. Para ello los parásitos (amastigotes y promastigotes) obtenidos por centrifugación, como se explicó anteriormente, fueron fijados en cubreobjetos de cristal. Para ello, la pastilla de parásitos recuperados se resuspendió en 1ml de PBS, se tomó 50 μ l y se colocó la gota sobre cubreobjetos de vidrio, se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min o hasta que estaba completamente seca la superficie. Los parásitos ya fijados de cada estadio se separaron en dos grupos esto para manejar dos condiciones, una sin permeabilizar y otra en la que se llevó un proceso de permeabilización, para este último las preparaciones se incubaron con metanol por 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente los parásitos permeabilizados y no permeabilizados fueron incubados con suero fetal bovino 10% en PBS por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Los parásitos se lavaron con PBS y se incubaron con los sueros preinmunes (control negativo), anticuerpos policlonales anti-LmxMBA (sueros de ratones obtenidos después de 2 inmunizaciones con la proteínas recombinante o con el plásmido pVAX::LmxMBA) y sueros de ratones no inmunizados y retados con el parásito (control positivo) a una dilución de 1:50 en PBS durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se lavaron 6 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo de chivo anti-IgG de ratón acoplado a FITC por 1:30 hora a 37°C, los parásitos se lavaron con PBS, las preparaciones se montaron con VectaShield acoplado a DAPI y se observaron mediante microscopia confocal.

11.RESULTADOS

Con la finalidad de encontrar un antígeno capaz de desencadenar una respuesta inmune protectora contra la leishmaniasis, se decidió evaluar si la vacunación con la proteína recombinante *LmxMBA* (seleccionada mediante vacunología reversa) y el gen que la codifica, genera un efecto terapéutico contra la infección por *Leishmania mexicana* en un modelo murino.

Mediante análisis bioinformático del genoma de *L. mexicana*, se seleccionaron las proteínas que poseían hélices transmembranales con el programa TMHMM 2.0, este servidor en línea predice con un 97-98% de efectividad, la localización y orientación de alfa hélices transmembranales en secuencias de proteínas. Este programa se utilizó para hacer una clasificación de las proteínas en membranales y no membranales. Las proteínas membranales se analizaron mediante el programa CELLO2GO, este servidor utiliza BLAST para buscar secuencias homólogas que están en una base de datos interna derivada de la base de datos UniProt. Al mismo tiempo, CELLO predice al menos una localización subcelular sobre la base de datos de las especies en las que se encuentra la proteína. Este sistema de clasificación utiliza los siguientes criterios para hacer la clasificación: la composición de aminoácidos, la composición de di-péptido y la composición de la secuencia basada en las propiedades físico-químicas de aminoácidos. De esta manera, se seleccionaron las proteínas membranales ubicadas en membrana plasmática de las cuales se escogió una expresada en cada estadio del parásito y una compartida en los dos estadios.

La proteína finalmente seleccionada, corresponde a una fosfatasa ácida de membrana plasmática de promastigotes de *L. mexicana*. Esta proteína consta de 516 aa, posee dos regiones transmembranales y una región extramembranal que comprende 450 aa (Fig. 4).

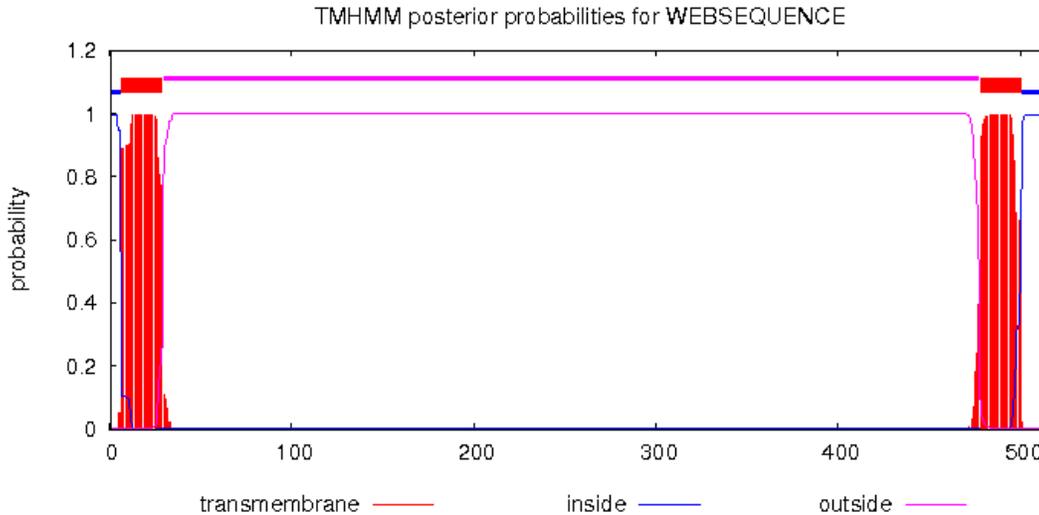


Figura 4. Predicción de hélices transmembranales. Se observa la localización de las regiones transmembranales en rojo, porciones citoplasmáticas en azul y porciones extramembranales en rosa. La proteína LmxMBA seleccionada posee dos regiones transmembranales que comprenden del aminoácido 7 al 29 y del 478 al 500; la región extramembranal incluye del aminoácido 30 al 477.

A partir de la región extramembranal de la proteína, se hizo la predicción de epítomos para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos, mediante los programas LEPS Y CTLPred respectivamente. La región extramembranal usada para la predicción y los epítomos predichos se muestran en la figura 5.

PMYKVELVQVVHRH GAPSFLVDDNHTL ICGTEFPCGFLNYEGQAMLVNLGKYLHHRY TENPSVWSKPYG P
 YSWYNLSISYTRSTDVLRRTLQSANGLLQGLFPMSTFFPAIHAVGRKEDVLLHSYMVPMIRARFNYAKEE
 LRAVCDEVLDRLMSFDQLQAVAAEVHSQRFANYTLRSRCAKRLCDIGRAYEPTGRLESPLLSRHLDDV
 CAVTAMSSYFYFAYNA SNELVGRGGR PFYHLAKLLVSNMVAH QRETAPPYKLYEYS SHDTT SPLAVSF
QNSNR AMLPPFGTAFI IELLSLT DAPAAPS SFYVRLLRGH SGVRPES FTFALSHFDMRC QDANTNY
ATDNICPFADFERFIN STAPTSPMGT CYLDPGLLFRMDCPIDV SDNRS SEDCLFYRQHCSNY SGGTGY
 YLDAIDYGCHRIPANNSTAGSSPMSSGGIA

Figura 5. Predicción de epítomos para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos. En amarillo se resaltan los epítomos para linfocitos T citotóxicos y subrayado los epítomos para linfocitos B.

Finalmente para obtener el DNA que codifica para el fragmento seleccionado de *LmxMBA* se diseñaron oligonucleótidos específicos, incluyendo las secuencias de reconocimiento para restricción enzimática (Tabla 2).

11.1. Amplificación y clonación del gen *LmxMBA* a partir de ADN genómico de *Leishmania mexicana* en el plásmido pVAX1.

Para obtener el fragmento de ADN (1337 pb) que codifica para la región extramembranal de la proteína, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen incluyendo secuencias de reconocimiento para restricción enzimática, para HindIII hacia el extremo 5' y EcoRI hacia el extremo 3'. La secuencia correspondiente al gen *LmxMBA* se obtuvo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de *L. mexicana* (Fig. 6A). El producto amplificado fue clonado en el vector pCR4-TOPO generando el plásmido pTOPO::*LmxMBA*. Se obtuvieron colonias transformantes con las cuales se realizó PCR colony para verificar cuales tenían el inserto (Fig. 6B). De las colonias positivas se seleccionó una para realizar purificación de DNA plasmídico y hacer análisis por restricción enzimática para comprobar que se tenía clonado el gen de interés (Fig. 6C).

El inserto *LmxMBA*, liberado del plásmido generado (TOPO::*LmxMBA*), se subclonó en el vector de expresión, pVAX1. Las colonias transformantes obtenidas se analizaron mediante PCR colony para verificar cuales tenían el inserto (Fig. 7A). De este ensayo de subclonación se obtuvieron 5 colonias positivas, se seleccionó una de éstas, y se hizo extracción y purificación de ADN plasmídico; el ADN se restringió con la enzimas HindIII/EcoRI para comprobar que se tenía subclonado el gen de interés. El tamaño de los productos esperados era de 2999 pb y 1337 pb aproximadamente (Fig. 7B). Finalmente, se realizó secuenciación del plásmido generado, pVAX1::*LmxMBA*, para comprobar la correcta orientación del inserto dentro del vector.

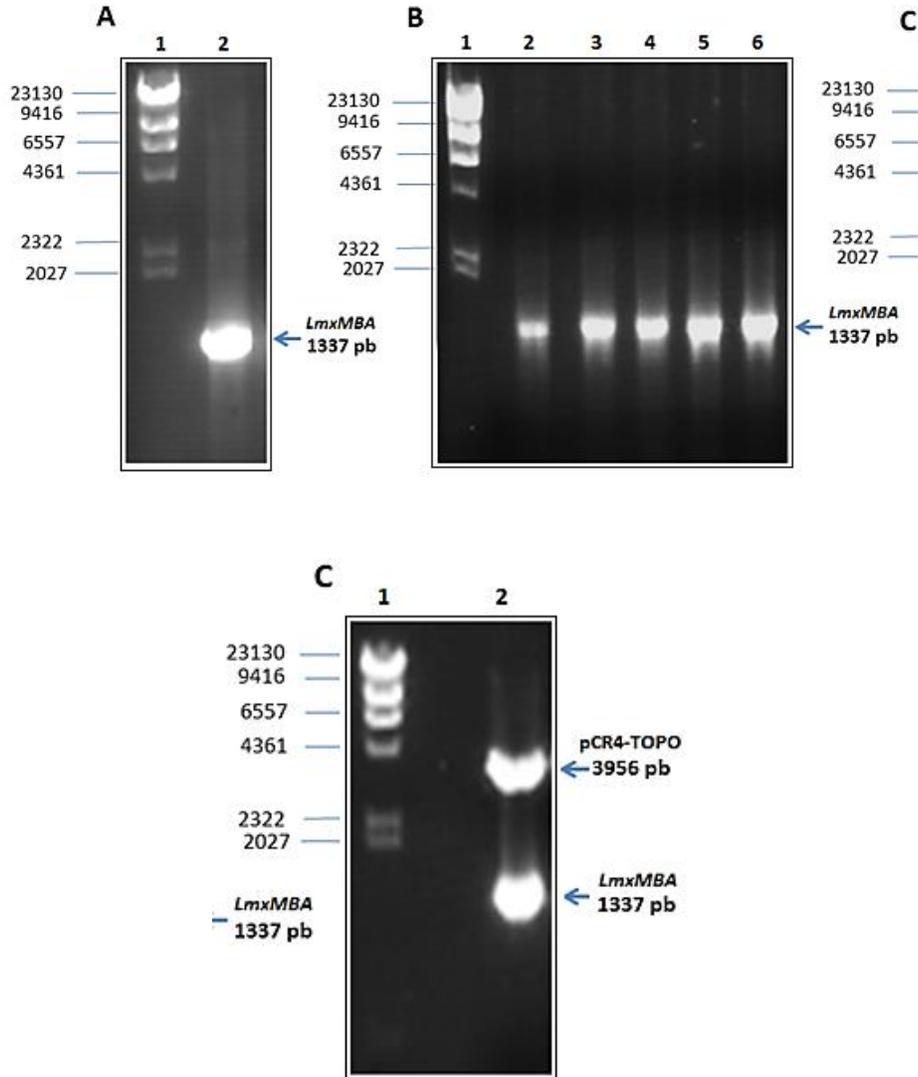


Figura 6. Amplificación y clonación del gen LmxMBA en el vector pCR4-TOPO. (A) El gen LmxMBA fue amplificado a partir de ADN genómico de *L. mexicana*, carril 1) MPM, carril 2) producto PCR (1337 pb). **(B)** PCR colony a partir de las colonias transformadas con el plásmido TOPO::*LmxMBA*. Carril 1) MPM, carriles 2-6), productos PCR. **(C)** Análisis por restricción enzimática de la construcción TOPO::*LmxMBA*. Carril 1) MPM, carril 2) liberación del inserto clonado, con HindIII / EcoRI.

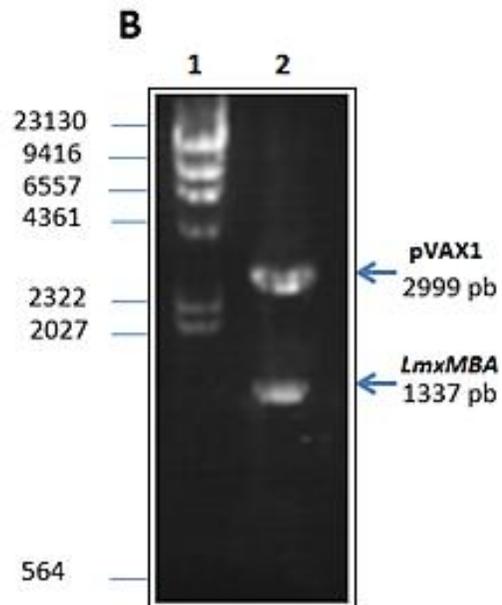
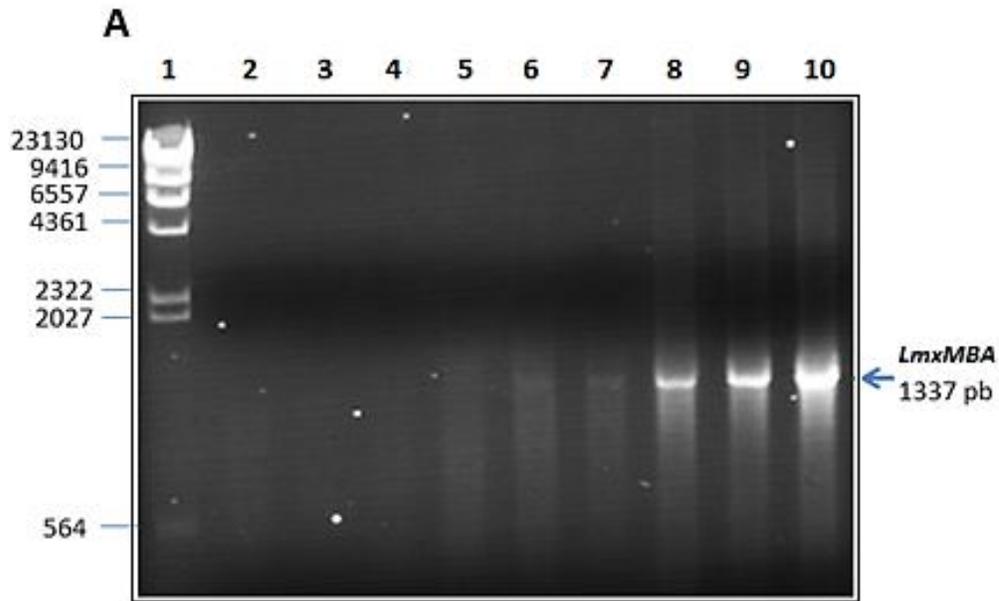


Figura 7. Subclonación del fragmento *LmxMBA* en el vector pVAX1. (A) PCR colony a partir de las colonias transformadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. Carril 1) MPM, carriles 2-10), productos PCR. **(B)** Análisis por restricción de la construcción pVAX1::*LmxMBA*. Carril 1) MPM, carril 2) liberación del inserto clonado con HindIII / EcoRI.

11.2. Expresión de la proteína *LmxMBA* en células transfectadas

Para estudiar la expresión de la proteína *LmxMBA* en un sistema eucariota, se llevaron a cabo ensayos de transfección de células HeLa con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. La transfección se realizó como se describió anteriormente en materiales y métodos. Las células se recogieron 48 h post-transfección y se extrajo el ARN, a partir del cual se obtuvo el ADNc. El ADNc se amplificó por PCR utilizando los “primers” anteriormente mencionados. Los productos amplificados se analizaron en un gel al 1% de agarosa (Fig. 8A).

Como se puede ver en la figura 8A, solo hubo amplificación del gen en células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. Como control se utilizaron primers que amplificaban un gen de expresión constitutiva, GAPDH, con un tamaño esperado de 400 pb (Fig. 8B).

La expresión de la proteína *LmxMBA* se analizó por inmunotransferencia de extractos celulares. Como se puede observar en la figura 8C, solo en extractos de células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* se detectó la proteína (47 kDa) lo cual se determinó mediante inmunotransferencia con el anticuerpo anti-*LmxMBA*. Por el contrario, en extracto de las células HeLa transfectadas con el vector pVAX1 o en extracto de células sin transfectar fue evidente la ausencia de la proteína *LmxMBA*. De este experimento se concluye que el fragmento del gen *LmxMBA* subclonado en el vector pVAX1 es capaz de expresarse en células eucariotas.

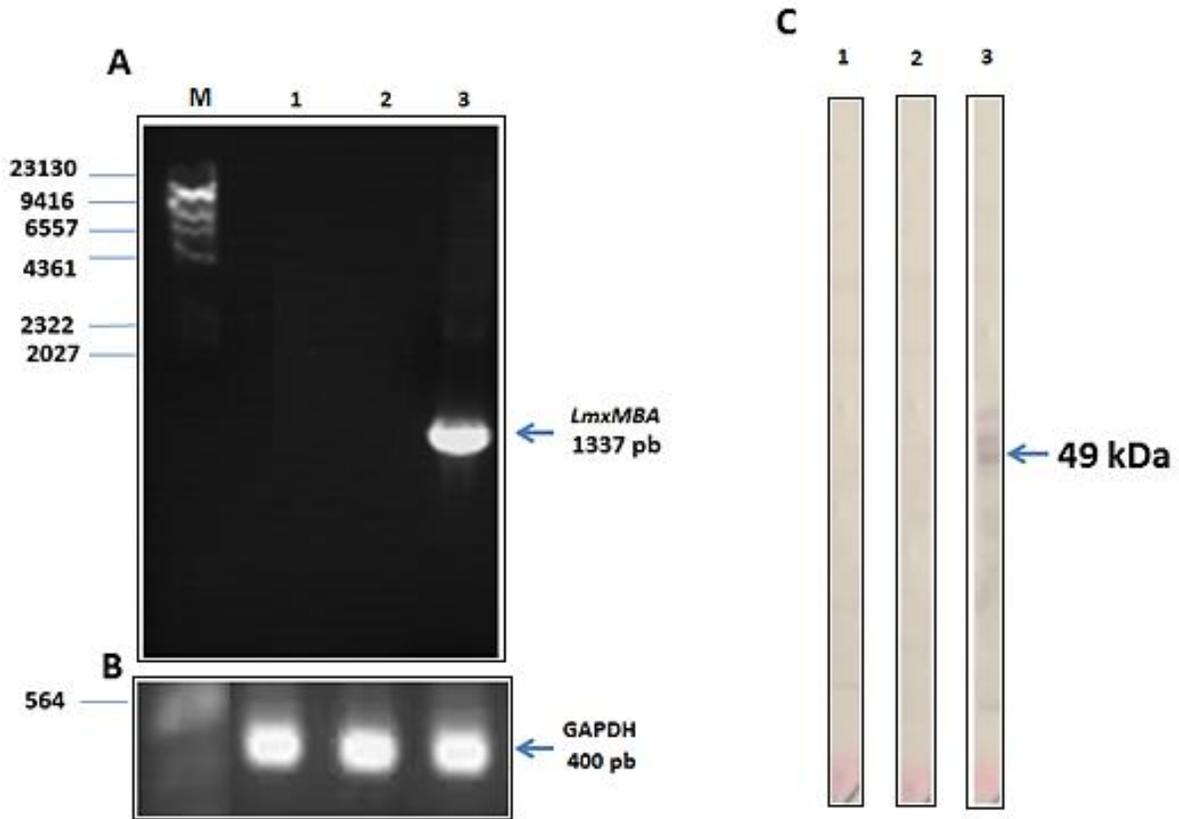


Figura 8. RT-PCR e inmunotransferencia de la proteína *LmxMBA* expresada en células HeLa transfectadas con el plásmido. (A) RT-PCR (B) como control se utilizaron primers que amplificaban un gen de expresión constitutiva, GAPDH (C) inmunotransferencia (1) Células HeLa sin transfectar. (2) Células HeLa transfectadas con pVAX1. (3) Células HeLa transfectadas con pVAX1::*LmxMBA*.

11.3. Expresión y purificación de la proteína recombinante

Se partió del plásmido pRSETA::*LmxMBA* que previamente había sido diseñado y construido en el laboratorio. Con éste se transformaron bacterias BL21(DE3)pLysE y se hizo la purificación de la proteína por columna de afinidad, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Los eluidos de la purificación se analizaron por PAGE-SDS e inmunotransferencia utilizando el anticuerpo anti-*His*. La figura 9A, muestra un observar PAGE-SDS al 12%, en donde se corrieron 4 eluidos de la purificación de la proteína, en donde se observa la proteína del tamaño esperado, sin embargo, también se observaron productos de degradación, por lo cual se decidió electroeluir la proteína (Fig. 9B). Como se puede ver en la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-*His*, se logró una correcta electroelusión de la proteína, visualizada en el peso esperado (49kDa) (Fig. 9C).

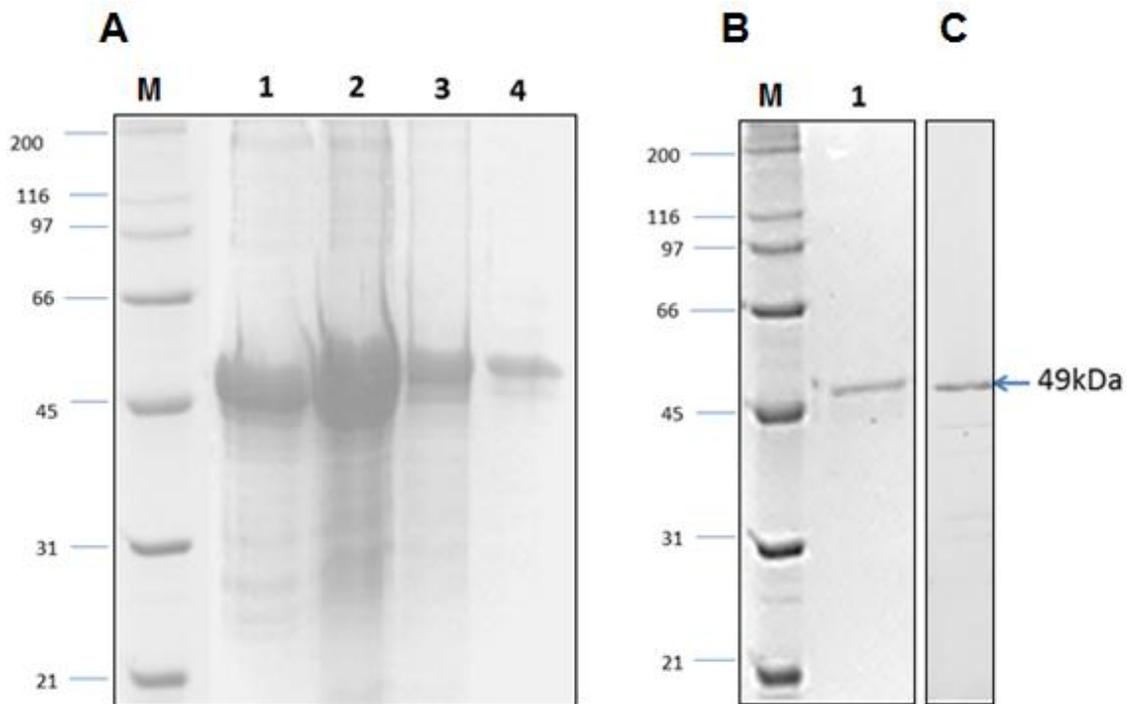


Figura 9. Purificación de la proteína recombinante *LmxMBA*. Bacterias BL21(DE3)pLysE se transformaron con el plásmido pRSETA::*LmxMBA* y se indujo la expresión de la proteína con 1mM de IPTG. **(A)** Alícuotas de los eluidos de la purificación fueron corridos en PAGE-SDS al 12% y tiñidos con azul brillante de Coomassie. **(B)** PAGE-SDS de la proteína *LmxMBA* electroeluida. **(C)**

Inmunotransferencia de la proteína *LmxMBA* electroeluida incubada con un anticuerpo anti-His (1:500).

11.4 Determinación de anticuerpos obtenidos por inmunización con DNA y proteína.

Para obtener anticuerpos necesarios para ensayos posteriores, se inmunizaron ratones BALB/c con 100 µg del plásmido pVAX1::*LmxMBA* por vía intramuscular en 3 ocasiones o con 10 µg de la proteína recombinante *rLmxMBA/Titer-max* por vía intraperitoneal en 2 ocasiones. La producción de anticuerpo se monitoreó analizando los sueros un mes después de la última inmunización en ambos casos.

La determinación de anticuerpos anti-*rLmxMBA* producidos por ratones inmunizados con la proteína homóloga o con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* fue llevada a cabo mediante inmunotransferencia (Fig. 10). Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína fueron incubados (1:100) con la proteína recombinante *rLmxMBA* transferida a membranas de nitrocelulosa. Como se observa en la figura 10A, los anticuerpos generados por la inmunización con *rLmxMBA* reconocieron a la proteína homóloga a la altura esperada (49 kDa).

En cuanto a la determinación de anticuerpos generados por la inmunización con plásmido pVAX1::*LmxMBA*, hubo menor reconocimiento de la proteína recombinante *rLmxMBA* transferida a la membrana de nitrocelulosa (Fig. 10B), por lo cual se decidió realizar ensayos de ELISA (Fig. 11) con la proteína *rLmxMBA* para analizar en nivel de anticuerpos generados por los dos tipos de inmunización.

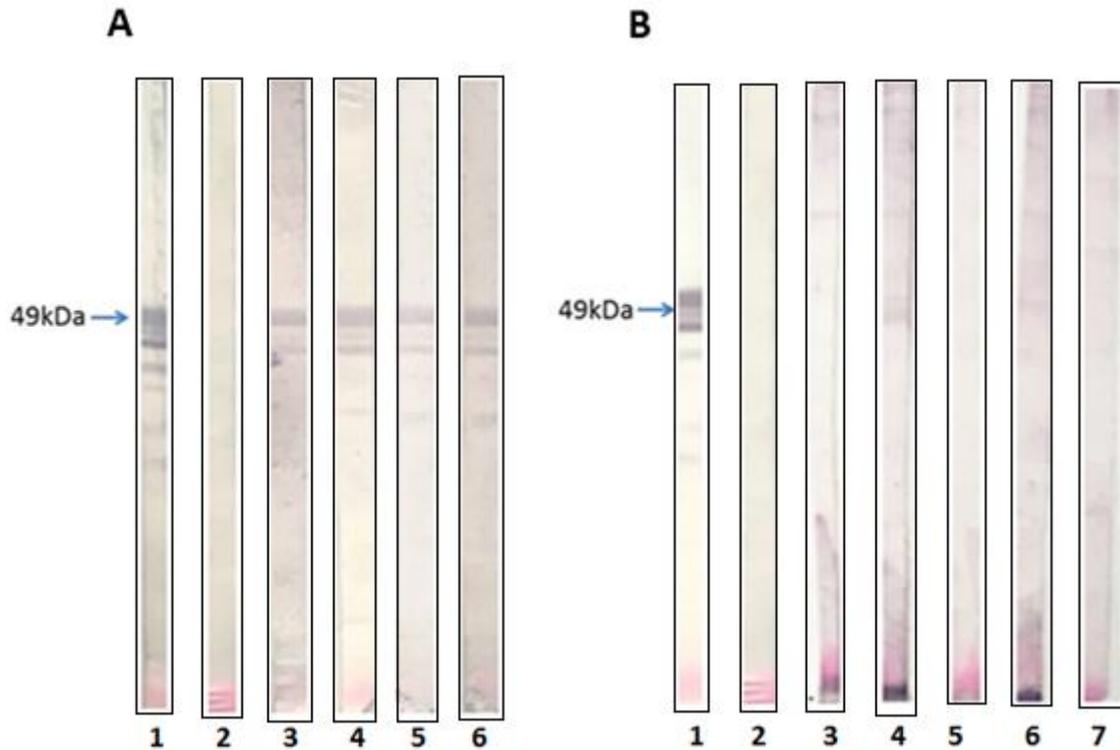


Figura 10. Determinación de anticuerpos anti-*LmxMBA* en ratones inmunizados. (A) ratones BALB/c fueron inmunizados en 2 ocasiones vía i.p. con 10 μ g de la proteína recombinante *LmxMBA*. **(B)** ratones BALB/c fueron inmunizados en 3 ocasiones vía i.m. con 100 μ g del plásmido pVAX1::*LmxMBA*. Los sueros de los ratones fueron incubados 1:100 con la proteína recombinante *rLmxMBA* transferida a membranas de nitrocelulosa. Pool de sueros preinmunes (carril A2 y B2); sueros inmunes (carriles A3-A6 y B3-B7). Como control se usó un anticuerpo anti-His (carril A1 y B1)

Para la determinación de anticuerpos anti-*LmxMBA* por ELISA se recubrieron las placas con 5 μ g/ml de la proteína *rLmxMBA* y se siguió el procedimiento mencionado anteriormente en materiales y métodos. Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína *rLmxMBA* y con el plásmido pVAX1::*MBA* se incubaron a una dilución de 1:50 y 1:200. Los pozos fueron incubados con un

anticuerpo peroxidado anti-ratón IgG, luego se agregó el sustrato: 2,2 azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6 sulfuric acid) y las lecturas se efectuaron a 405 nm.

En ambos casos, sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante o con ADN, se observó un aumento en el nivel de anticuerpos, en comparación con el pool de sueros de ratones pre-inmunes (Fig.11). Al comparar el nivel de anticuerpos generados por los dos tipos de inmunización fue evidente un mayor nivel de anticuerpos en los ratones inmunizados con la proteína recombinante, y un nivel ligeramente menor en ratones inmunizados con ADN (Fig.11).

Estos resultados indican que ambos métodos de inmunización, así como las dosis administradas resultaron adecuados para la generación de anticuerpos contra LmxMBA; tanto la inmunización con ADN (Fig. 11B) como con la proteína recombinante (Fig. 11A), estaban siendo efectivas.

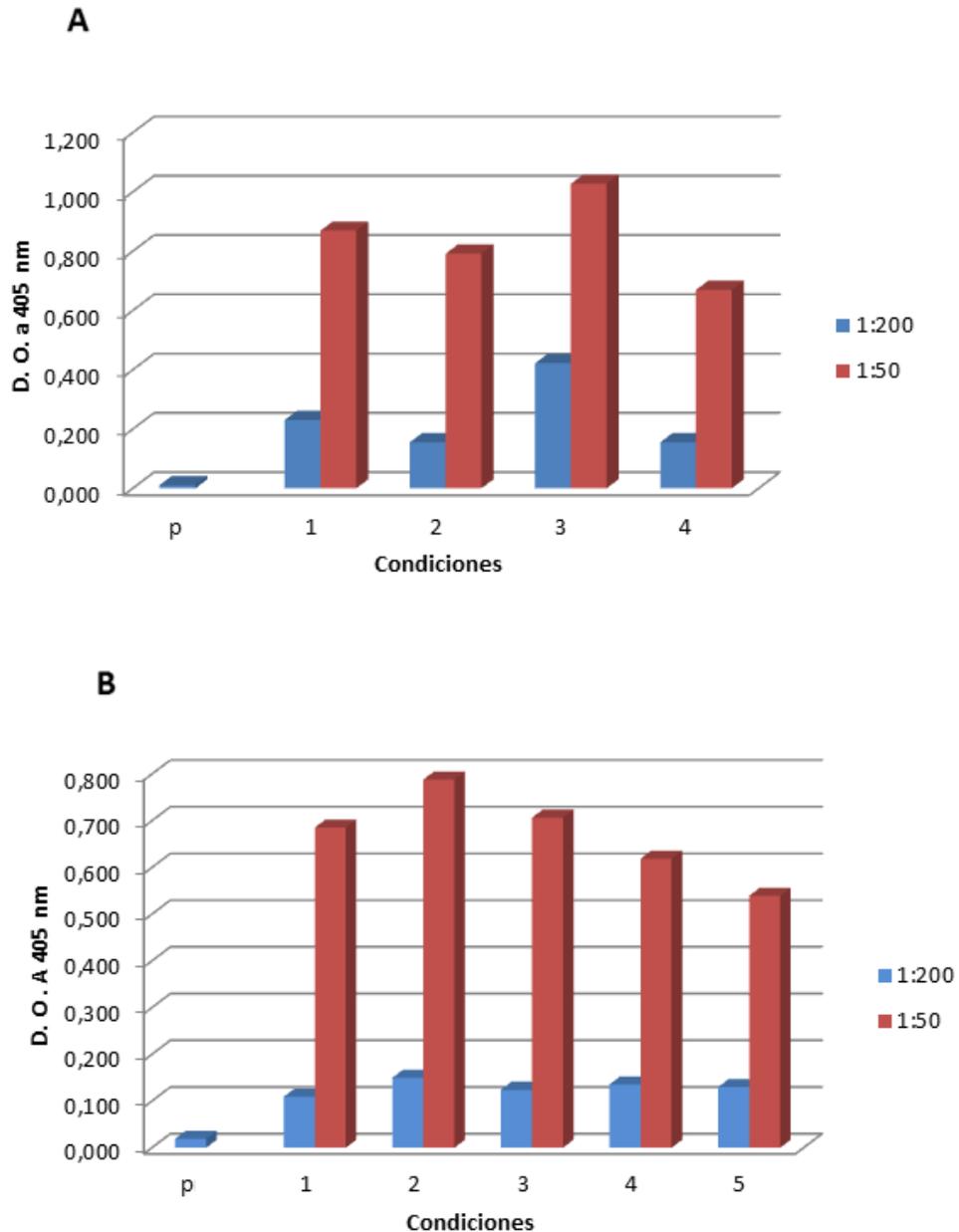


Figura 11. Determinación de anticuerpos anti-LmxMBA por ELISA. (A) suero de ratones BALB/c inmunizados en 2 ocasiones vía i.p. con 10 µg de la proteína recombinante *LmxMBA*, y recolectados 30 días después de la última inmunización (A1-A4). **(B)** suero de ratones BALB/c inmunizados en 3 ocasiones vía i.m. con 100 µg del plásmido pVAX1::*LmxMBA*, recolectados 30 días después de la última inmunización (B1-B5). Suero preinmune (p). Las muestras fueron ensayadas por triplicado.

11.5. Localización subcelular de las proteínas nativas.

Con la finalidad de analizar la distribución subcelular de la proteína nativa en el parásito, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia como se describe en materiales y métodos, usando los anticuerpos policlonales producidos por la inmunización con ADN y con la proteína recombinante. Como controles se utilizó el suero de ratones infectados con promastigotes de *L. mexicana* y suero preinmune de cada grupo experimental; estos sueros se ensayaron con amastigotes (Fig. 12) y promastigotes (Fig 13).

Los resultados mostraron que el suero de ratones infectados contiene anticuerpos que reconocen a los dos estadios (Fig. 12-2 y 13-2), mientras que los sueros preinmunes no presentan reconocimiento alguno (Fig. 12-1 y 13-1). Con respecto a los anticuerpos policlonales producidos por la inmunización con la proteína, éstos presentan reactividad con componentes de la membrana plasmática en los dos estadios (Fig.12-4 y 13-4), mas no así en el citoplasma de los mismos (Fig. 14 y 15). En cuanto al reconocimiento de los anticuerpos policlonales producidos por la inmunización con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* fue más intenso el reconocimiento de la proteína nativa tanto en membrana plasmática tanto de amastigotes(Fig. 12-3) como de promastigotes (Fig. 13-3) . En ninguno de los casos hubo reconocimiento en el citoplasma de ambos parásito (Fig. 14 y 15).

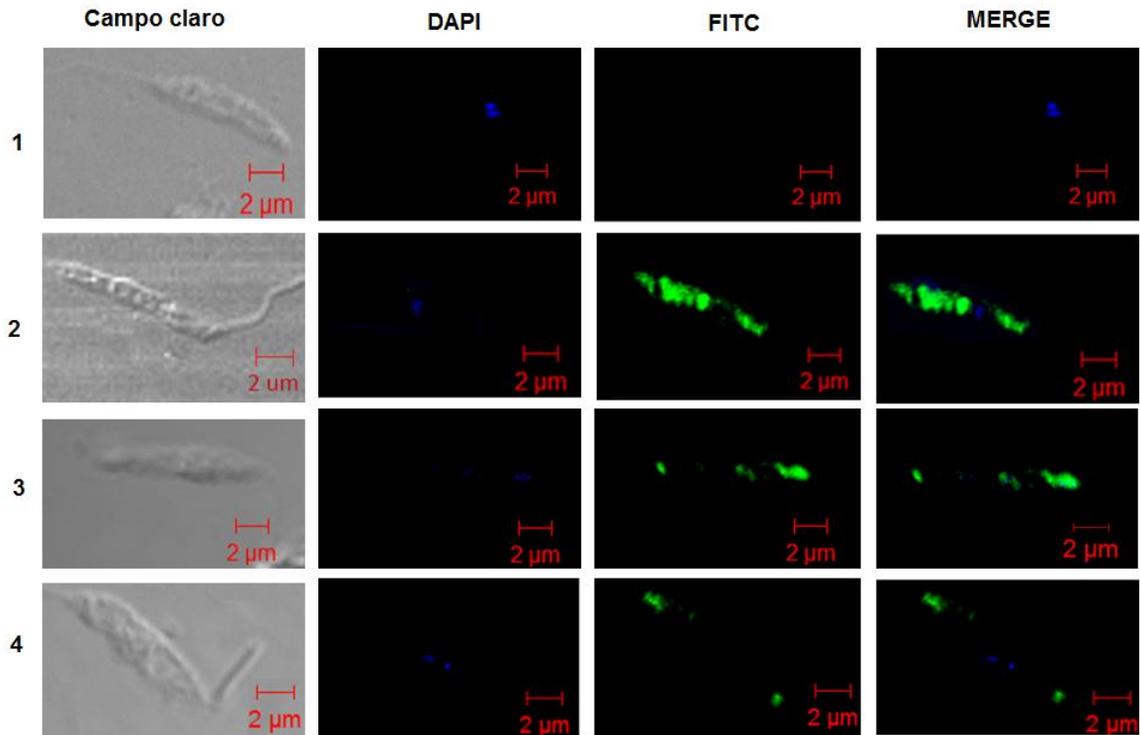


Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta de promastigotes de *L. mexicana* no permeabilizados. Se prepararon laminillas con promastigotes de *L. mexicana*, los parásitos fueron incubados con los sueros como se describió en materiales y métodos. (1) Control negativo: suero preinmune (2) control positivo: anticuerpo α -*Leishmania* (3) suero proveniente de ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* (4) suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante *LmxMBA*.

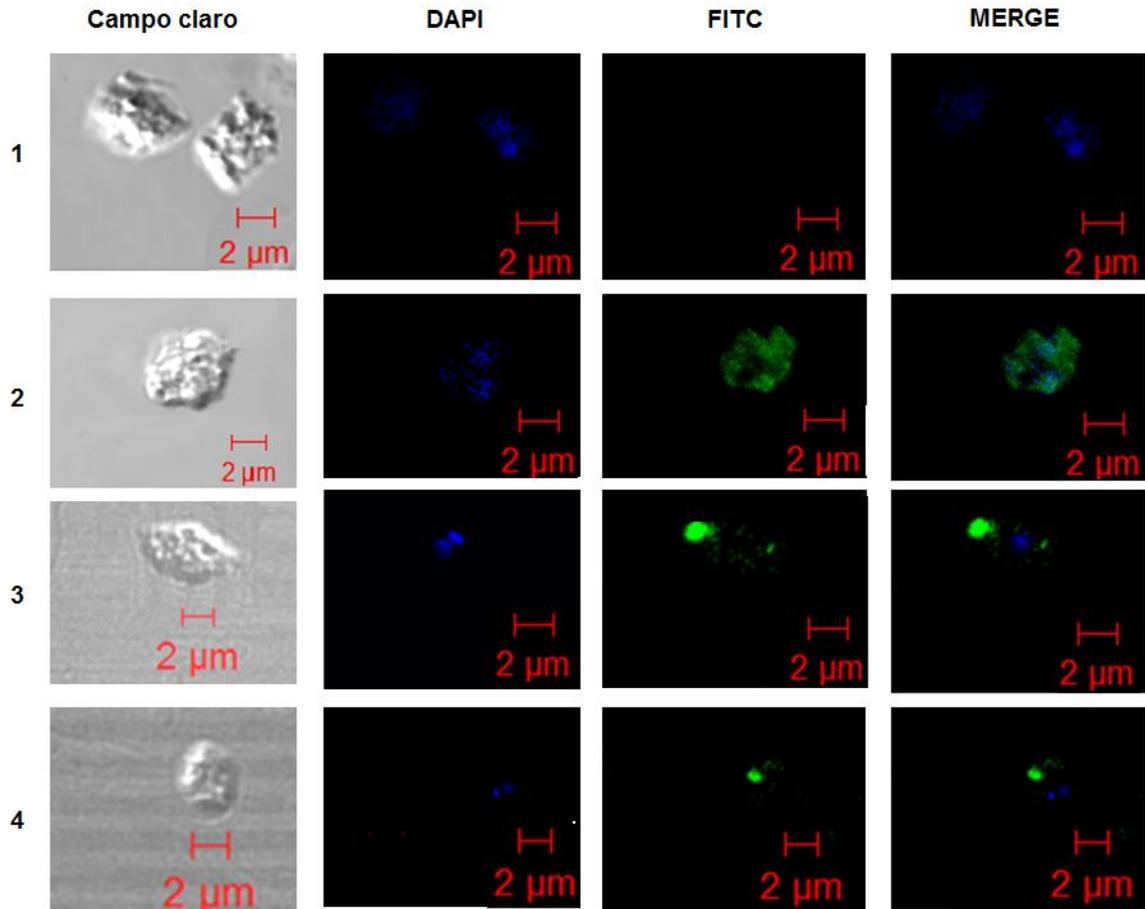


Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta de amastigotes de *L. mexicana* no permeabilizados. Se prepararon laminillas con amastigotes de *L. mexicana*, los parásitos fueron incubados con los sueros como se describió en materiales y métodos. (1) Control negativo: suero preinmune (2) control positivo: anticuerpo α -*Leishmania* (3) suero proveniente de ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* (4) suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante *LmxMBA*.

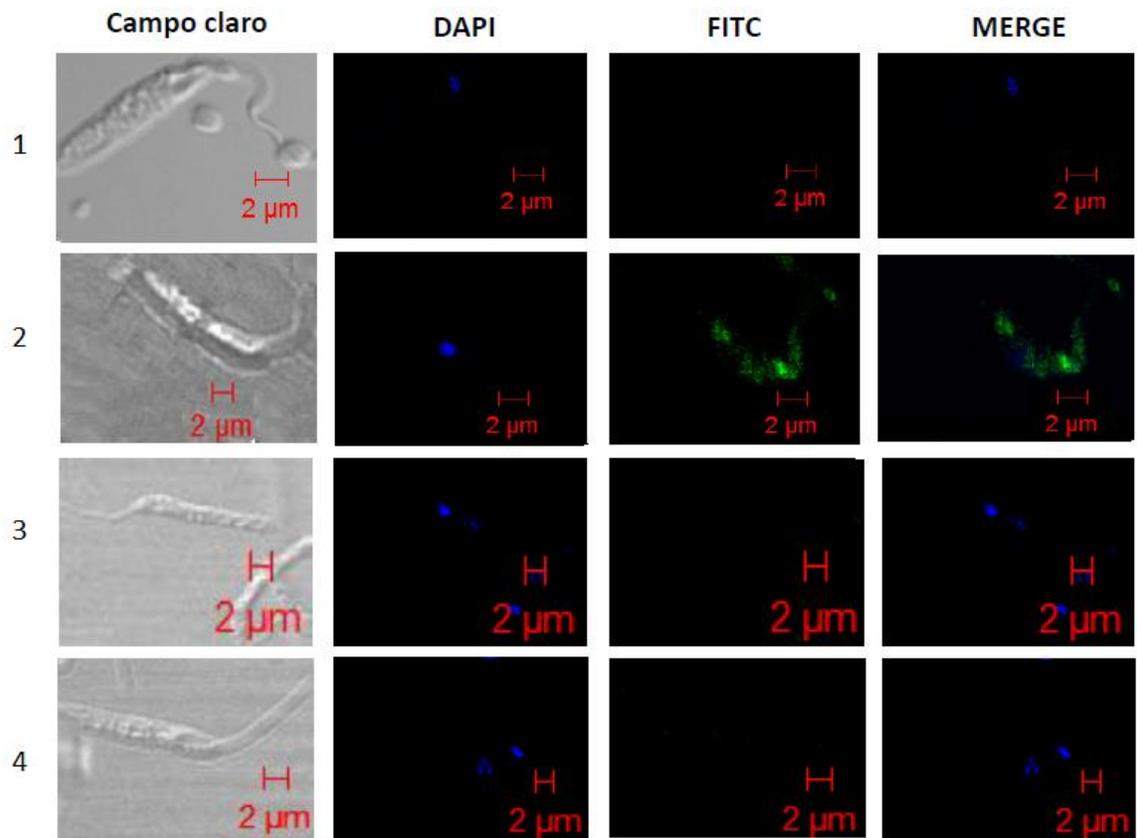


Figura 14. Inmunofluorescencia indirecta de promastigotes de *L. mexicana* permeabilizados. Se prepararon laminillas con promastigotes permeabilizados de *L. mexicana*, los parásitos fueron incubados con los sueros como se describió en materiales y métodos. (1) Control negativo: suero preinmune (2) control positivo: anticuerpo α -*Leishmania* (3) suero proveniente de ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* (4) suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante *LmxMBA*.

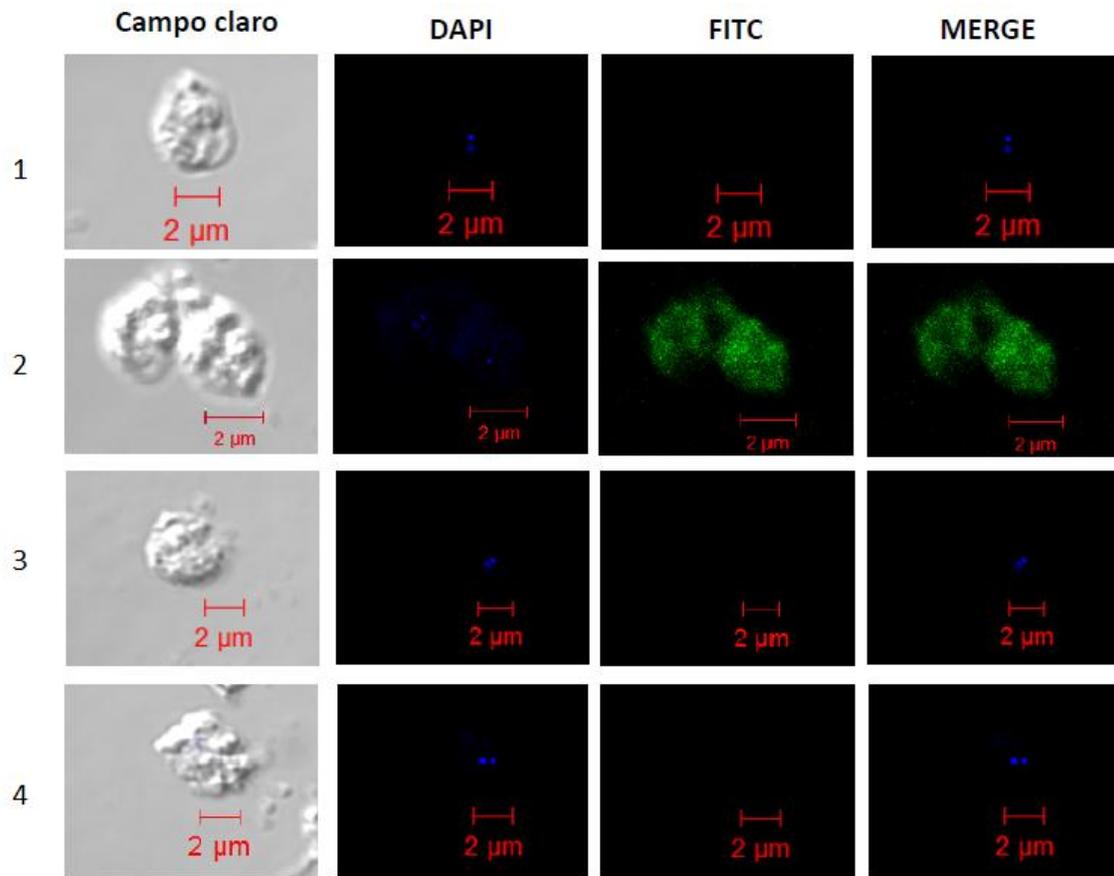


Figura 15. Inmunofluorescencia indirecta de amastigotes de *L. mexicana* permeabilizados. Se prepararon laminillas con amastigotes permeabilizados de *L. mexicana*, los parásitos fueron incubados con los sueros como se describió en materiales y métodos. (1) Control negativo: suero preinmune (2) control positivo: anticuerpo α -*Leishmania* (3) suero proveniente de ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* (4) suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante *LmxMBA*.

11.6. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN y proteína en ratones infectados con *L. mexicana*.

Para evaluar el efecto terapéutico de la vacunación con ADN o proteína, ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar con 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* y dos meses después de la infección los ratones fueron vacunados: Grupo 1, con el plásmido pVAX1::LmxMBA; Grupo 2, con el vector pVAX1; Grupo 3, sin vacunar. Para la vacunación con la proteína recombinante, de igual manera se manejaron tres grupos de ratones: Grupo 1, rLmxMBA+ titer max; Grupo 2, con titer max; Grupo 3, sin vacunar. Las vías de administración y dosis fueron descritas en materiales y métodos. El proceso de infección se evaluó mediante la medida del tamaño del cojinete plantar (mm) y la evolución de la enfermedad con y sin vacunación.

En la figura 16, se puede observar una línea de tendencia para los diferentes grupos de ratones. En el caso del grupo de ratones sin vacunar se presentó un aumento progresivo del tamaño del cojinete plantar desde el día 15 post-infección hasta el último día de la medición (135 días post-infección); no así con los ratones vacunados con el vector vacío, pVAX1, o con plásmido pVAX1::LmxMBA. En el grupo de ratones vacunado con pVAX1 se observó, aparentemente, un mejor efecto, aunque sigue presentándose aumento en el tamaño del cojinete plantar, este es menor en comparación con el grupo de ratones sin vacunar. En contraste, el tamaño del cojinete plantar del grupo de ratones vacunados con pVAX1::LmxMBA se mantuvo estable hasta el día 30 post-vacunación, después del cual se observó una ligera disminución que se conservó hasta el día 75 post-vacunación. En la figura 17, se observa el desarrollo macroscópico de la lesión después de 15, 45 y 75 días post-vacunación con ADN.

En cuanto a la vacunación con la proteína recombinante (Fig. 18), tanto los ratones vacunados con titer max, como los ratones sin vacunar presentaron el mismo comportamiento en el aumento de tamaño del cojinete plantar. Por otro lado, en los ratones vacunados con la proteína *rLmxMBA*, desarrollaron una

menor inflamación del cojinete plantar en comparación con los dos grupos anteriores. En la figura 19, se observa el desarrollo macroscópico de la lesión después de 15 y 30 días post-vacunación con la proteína recombinante.

Al comparar el efecto terapéutico generado por los dos tipos de vacunación, se evidenció mayor control de la infección en los ratones vacunados con ADN, ya que después de la primera vacunación no hay aumento en el tamaño de la lesión, a diferencia de los ratones vacunados con la proteína, en los que sigue presentándose un ligero aumento en el tamaño del cojinete plantar hasta el último día evaluado (día 30 post-vacunación). Sin embargo, se continuara dando seguimiento a la vacunación con la proteína recombinante hasta el día 75 post-vacunación, con el fin de comparar la evolución de la lesión durante el mismo periodo de tiempo en los dos tipos de vacunación.

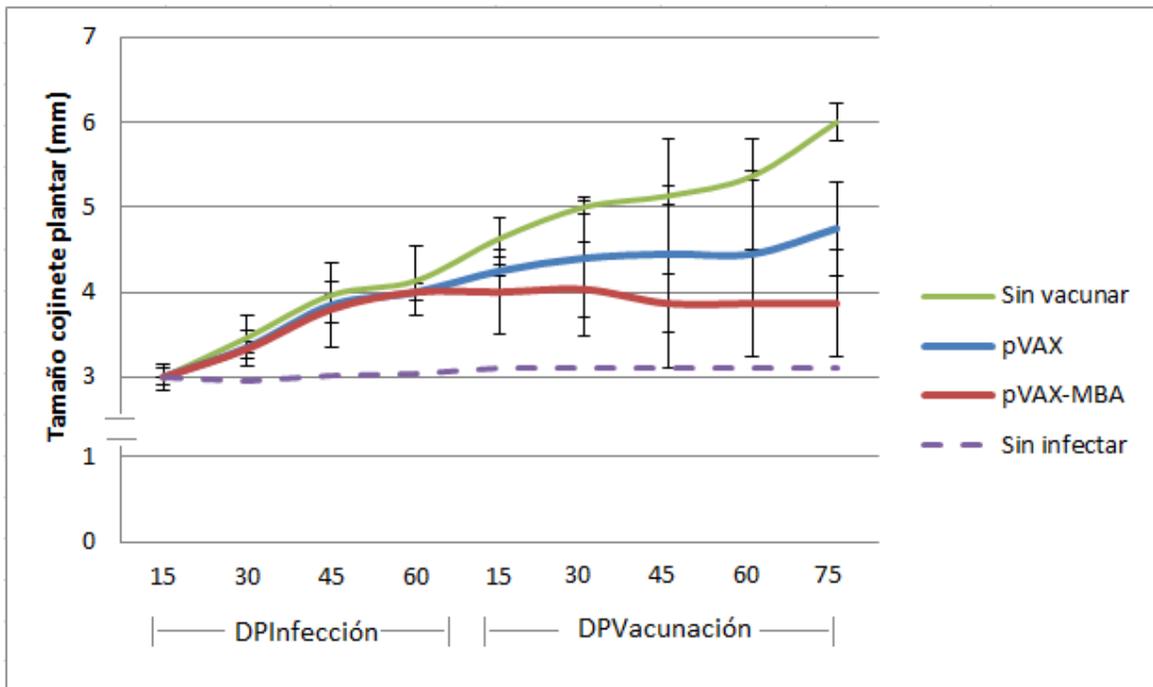


Figura 16. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN en ratones infectados con *L. mexicana*. Ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar derecho con 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* y 60 días post-infección se vacunaron: Grupo 1, con el plásmido pVAX1::LmxMBA; Grupo 2, con el vector pVAX1; Grupo 3, sin vacunar. Se realizó seguimiento de la lesión durante 60 días post-infección y 75 días después de la primera vacunación mediante la medición del tamaño del cojinete plantar cada 15 días. Como control, se realizó medición del cojinete plantar izquierdo (sin infectar) durante el mismo periodo. Las gráficas son representativas de al menos 3 animales por grupo.

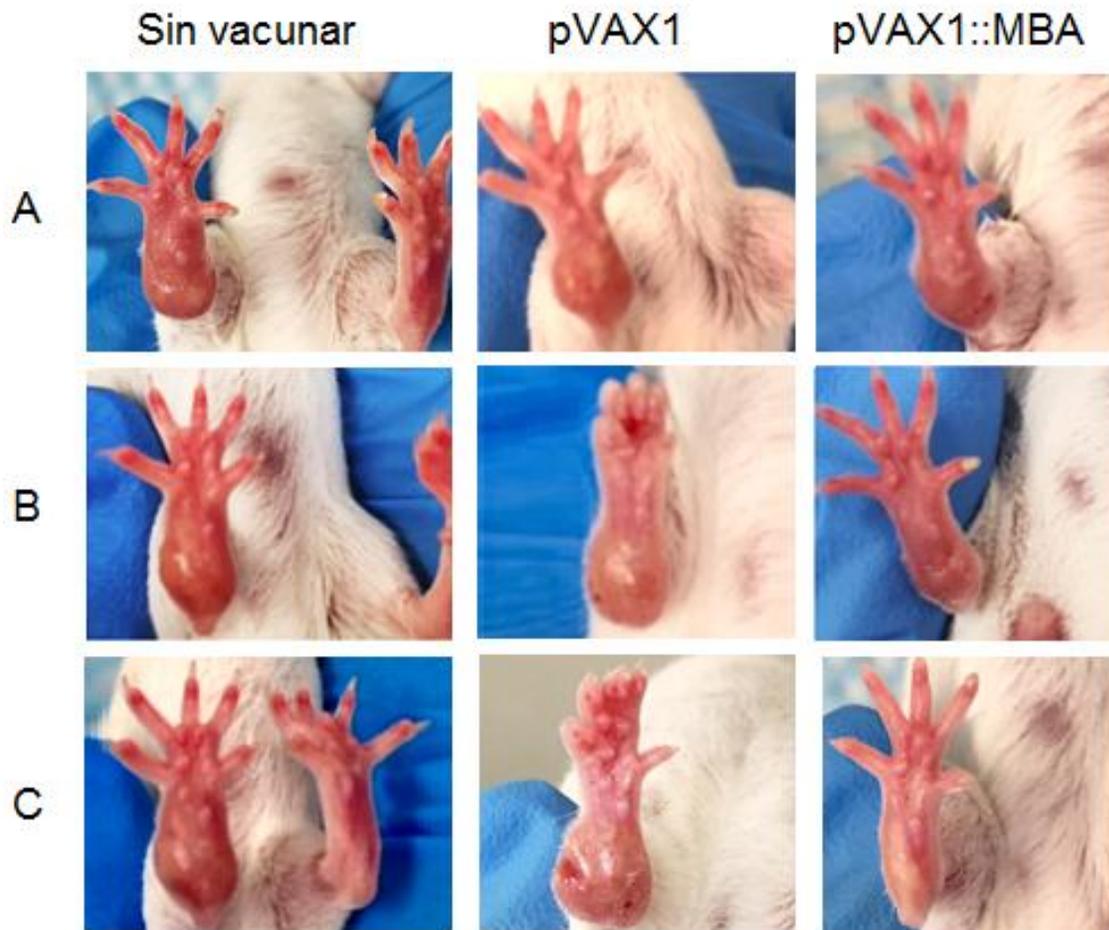


Figura 17. Desarrollo macroscópico de la lesión después de la vacunación con DNA. Cojinete plantar de ratones infectados con promastigotes de *L. mexicana* y posteriormente vacunados. 15 días **(A)**, 45 días **(B)** y 75 días **(C)** después de la primera vacunación con ADN.

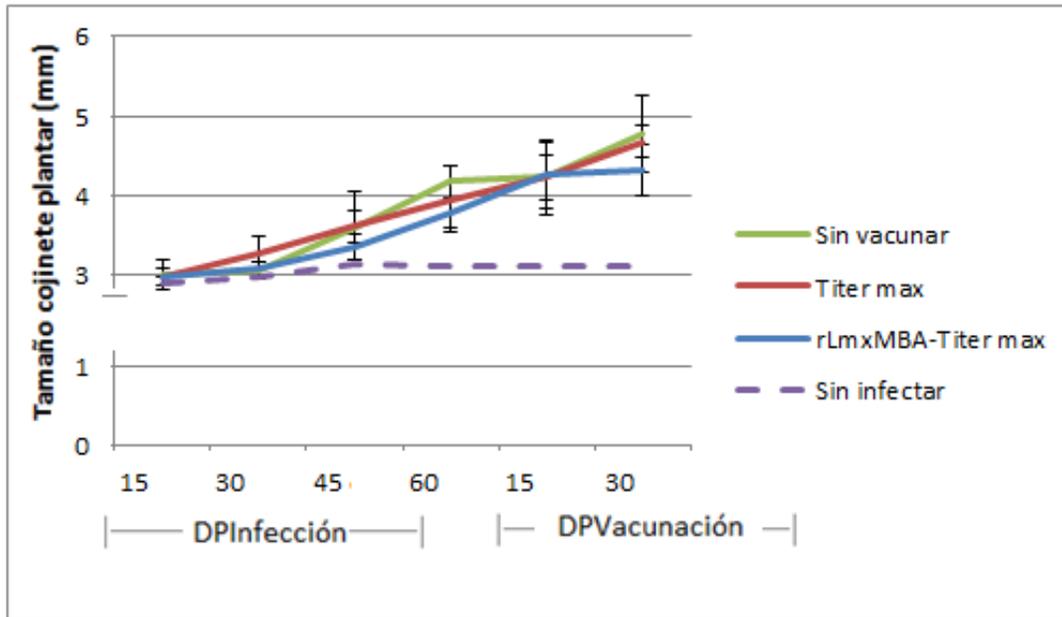


Figura 18. Efecto terapéutico de la vacuna de proteína recombinante en ratones infectados con *L. mexicana*. Ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar derecho con 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* y 60 días post-infección se vacunaron: Grupo 1, con la proteína *rLmxMBA/Titer max*; Grupo 2, con Titer-max; Grupo 3, sin vacunar. Se realizó seguimiento de la lesión durante 60 días post-infección y 30 días después de la primera vacunación. Como control, se realizó medición del cojinete plantar izquierdo (sin infectar) durante el mismo periodo. Las gráficas son representativas de al menos 4 animales por grupo.



Figura 19. Desarrollo macroscópico de la lesión después de la vacunación con la proteína recombinante. Cojinete plantar de ratones infectados con promastigotes de *L. mexicana* y posteriormente vacunados. 15 días (**A**) y 30 días después de la primera vacunación con *rLmxMBA*.

12. DISCUSIÓN

En la actualidad, el tratamiento de la leishmaniasis depende de la quimioterapia. El más frecuentemente utilizado consiste en fármacos derivados del antimonio pentavalente, anfotericina B, anfotericina B liposomal y paramomicina, entre otros. Un problema importante es que estos medicamentos están asociados con problemas de costo, alta toxicidad, larga duración del tratamiento y el desarrollo de resistencia al fármaco por parte del parásito. A pesar de los avances en las opciones de quimioterapia, es poco probable que la quimioterapia sola permita la eliminación de la enfermedad, y por lo tanto existe una necesidad de una vacuna eficaz.

A la fecha se han desarrollado diversas vacunas contra la leishmaniasis, éstas incluyen parásitos atenuados por irradiación con rayos gama, parásitos auto clavados, proteínas del parásito purificadas, proteínas recombinantes y en los últimos años, vacunas génicas que codifiquen para un antígeno del parásito. Sin embargo, aún no se cuenta con una vacuna 100% efectiva contra esta enfermedad.⁶¹

Las vacunas de ADN se han probado contra un número creciente de enfermedades. Algunos ejemplos incluyen enfermedades como tuberculosis^{69,70}, malaria⁷¹, o el SIDA^{72,73}, enfermedades infecciosas como influenza^{74,75}, papillomavirus⁷⁶, leishmaniasis^{77,78} o tripanosomiasis^{79,80}. Además de su uso para la prevención de la infección, se demostró que las vacunas de ADN tienen también un importante potencial para el tratamiento terapéutico de una infección por virus, bacterias o parásitos^{81,82}, lo que subrayó la versatilidad de esta estrategia y abrió nuevas perspectivas. Así, el uso terapéutico de las vacunas de ADN ha sido extendido a algunos tipos de cáncer, como linfoma, mieloma, cáncer de la próstata o de mama⁸³⁻⁸⁵, y enfermedades autoinmunes como la diabetes^{86,87}.

Por tal razón se decidió emplear este método de inmunización para inducir una respuesta inmune específica contra *L. mexicana* en ratones BALB/c y probar su eficacia terapéutica contra la infección experimental con el parásito. Para ello se

seleccionó el antígeno LmxMBA mediante el uso de un enfoque conocido como vacunología reversa, como se describió anteriormente, el cual se basa en el análisis de bases de datos del genoma del patógeno mediante herramientas bioinformáticas para identificar candidatos potenciales como vacuna.⁸⁹

El plásmido pVAX1::LmxMBA fue construido para dirigir la expresión del producto LmxMBA, bajo el control del promotor procariota *lacZ* o del promotor eucariota CMV. Inicialmente, el plásmido pVAX1::LmxMBA se expresó *in vitro* en una línea celular eucariota. Con ayuda de anticuerpos se detectó la expresión de la proteína LmxMBA en extractos de células HeLa transfectadas con el plásmido respectivo, mientras que, en células HeLa transfectadas con el vector vacío o células sin transfectar no se detectó ningún producto. Estos resultados sugieren que el diseño del plásmido fue exitoso.

Según la predicción de localización subcelular mediante análisis bioinformático, el antígeno LmxMBA corresponde a una proteína de membrana plasmática expresada en promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, se pudo determinar que los anticuerpos producidos por los animales inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA o con la proteína *rLmxMBA* fueron capaces de reconocer la superficie tanto de promastigotes, como de amastigotes de *L. mexicana*. Estos resultados nos indican que los anticuerpos generados por la inmunización con ADN o proteína fueron capaces de reconocer la proteína nativa presente en la membrana de los dos estadios del parásito. Al comparar el reconocimiento de los anticuerpos generados por la inmunización con la proteína recombinante, se observa un menor reconocimiento de la proteína nativa en el parásito, esto debido a que el antígeno inmunizado, es previamente generado en células procariotas que no tienen la maquinaria necesaria para producir la proteína recombinante con la conformación estructural y las modificaciones post traduccionales que podría tener la proteína nativa. Por el contrario, la inmunización con ADN, genera la expresión endógena de la proteína en las células del huésped, células eucariotas, de tal manera que el antígeno producido posee las modificaciones post traduccionales, conformación y oligomerización que induce anticuerpos de

especificidad óptima. Por lo cual, aunque se obtuvo un mayor título de anticuerpos con la inmunización con la proteína recombinante, los anticuerpos generados por la inmunización con ADN presentaron un reconocimiento más fuerte de la proteína nativa en los dos estadios del parásito.

En cuanto al efecto terapéutico generado por la vacunación con ADN en ratones previamente infectados con *L. mexicana*, se evidenció un control de la infección en los ratones vacunados con ADN, ya que después de la primera vacunación no hubo aumento en el tamaño de la lesión plantar y 45 días post-vacunación se logró una disminución de la lesión, mientras que los ratones vacunados con la proteína recombinante, el tamaño del cojinete plantar continuó aumentando ligeramente hasta el último día evaluado (día 30 post-vacunación). Por otra parte, se observó que los ratones vacunados con el vector vacío, pVAX1, también presentaron una mejoría, en comparación con el grupo de ratones sin vacunar, esto debido a que el ADN plasmídico produce en las bacterias y por lo tanto contiene motivos CpG no metilados y estos tienen un efecto adyuvante por sí mismos a través de la estimulación del sistema inmune innato a través del receptor Toll-like 9 (TLR-9).⁹⁰

La vacunación con ADN ha demostrado capacidad para inducir respuesta inmune tanto humoral como celular. Se piensa que las vacunas de ADN pueden inducir la presentación de antígenos a través de las vías tanto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I como del CMH clase II, lo que lleva a la activación de células T cooperadoras CD4+ y citotóxicas CD8+.⁹¹ Las células Th1 pueden activar macrófagos para destruir microorganismos intracelulares de manera más eficiente y también activar las células B para producir anticuerpos fuertemente opsonizantes tales como IgG2a e IgG2b en ratones.⁵¹

En la leishmaniasis, se ha demostrado que la respuesta celular Th1 es protectora, y al contrario, cuando se genera una respuesta celular Th2 la infección no es controlada.⁹² La infección con *L. major* o *L. mexicana* en ratones resistentes, conduce a la inducción preferencial de linfocitos Th1 secretores de IL-2, INF- γ y TNF- α . Estas citocinas activan a los macrófagos para la eliminación de los

parásitos vía síntesis de óxido nítrico; así mismo, se conoce que estas citocinas regulan la producción de isotipos IgG3 e IgG2a. Por el contrario, la infección de ratones susceptibles, conduce a la activación de linfocitos Th2 productores de IL-4 e IL-10 que regulan de forma negativa la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG2b.⁹²

En conclusión, los resultados aquí presentados apoyan la inmunización con ADN como estrategia para el diseño de vacunas anti-*L. mexicana*. Usando el gen LmxMBA se demostró que este tipo de inmunización fue eficiente en la inducción de anticuerpos antígeno específicos. La vacunación con ADN confirió cierto efecto terapéutico contra la infección experimental con *L. mexicana* en ratones BALB/c.

Dicha información puede proveer un apoyo para el desarrollo de vacunas basadas en ADN que no solamente protejan a los seres humanos del riesgo de infección, sino que también pueden aliviar o prevenir las respuestas patológicas características de la LCL al reducir o eliminar los parásitos en los tejidos de pacientes infectados.

13. CONCLUSIONES

1. Las bacterias transformadas con el plásmido pRSETA::LmxMBA e inducidas, expresan la proteína respectiva.
2. Las células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::LmxMBA expresan la proteína homóloga 48 h postransfección.
3. Los ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA o con la proteína recombinante *rLmxMBA* produjeron anticuerpos.
4. Los anticuerpos anti-*rLmxMBA* reconocen a la proteína nativa y a la proteína recombinante *rLmxMBA*.
5. La proteína nativa se expresa en la superficie de amastigotes y promastigotes de *L. mexicana*
6. La vacunación con el plásmido pVAX1::LmxMBA posterior a la infección experimental de ratones BALB/c con promastigotes de *L. mexicana* redujo el tamaño de la lesión (inflamación del cojinete plantar), no así, con la vacunación con la proteína recombinante.

14. PERSPECTIVAS

- Analizar el isotipo de anticuerpos obtenidos por la inmunización con ADN y proteína.
- Determinar las citocinas séricas producidas por inmunización con ADN plásmidico y por inmunización con la proteína recombinante.
- Analizar la presencia del parásito en el cojinete plantar de ratones vacunados mediante ensayos de PCR.
- Evaluar el efecto terapéutico de la vacunación con DNA en ratones previamente infectados con *L. mexicana*, durante mayor tiempo y con diferentes dosis del plásmido y del parásito.
- Realizar ensayos de protección en los que se inmunicen ratones con ADN plasmídico y posteriormente hacer el reto parasitario.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. (2012). Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide.
2. World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser*;949(xii-xiii):1e186.
3. Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in parasitology*, 26(10), 466-469.
4. Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238-245.
5. Garcia, L. S. (2006). *Diagnostic medical parasitology*. American Society for Microbiology Press.
6. Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology*, 37(10), 1063-1075.
7. Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. *Trends in microbiology*, 11(5), 210-214.
8. Botero, D., Restrepo, M., Angel, R., & Parra, G. J. (1998). *Parasitosis humanas* (pp. 12-16). Medellín: Corporación para investigaciones biológicas.
9. Hall, L. R., & Titus, R. G. (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, 155(7), 3501-3506.
10. Marsella, R., & de Gopegui, R. R. (1998). Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *International journal of dermatology*, 37(11), 801-814.
11. Magill, A. J. (1995). Epidemiology of the leishmaniases. *Dermatologic clinics*, 13(3), 505-523.

12. Pearson, R., & Queiroz Souza, A. (1997). Especies de leishmania: leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. *Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas, principios y práctica. 4a ed. B. Aires: Panamericana Ed, 2724-35.*
13. Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology, 58, 227-250.*
14. Lainson, R., Shaw, J. J., Silveira, F. T., De Souza, A. A. A., Braga, R. R., & Ishikawa, E. A. Y. (1994). The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 89(3), 435-443.*
15. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., & den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one, 7(5), e35671.*
16. World Health Organization (WHO). (2012). Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. Geneva, Switzerland: WHO.
17. World Health Organization (WHO). (2010). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.
18. Romero Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. *Raúl. 3ª Edición. Barcelona: Médica Panamericana.*
19. Rodríguez Domínguez, J. (2009). Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina, 45(003)*
20. Organización Mundial de la Salud. Informe final. (2014) 2ª Reunión de los Programas Nacionales de Leishmaniasis en las Américas. Ciudad de Panamá- Panamá.
21. World Health Organization (WHO). (2015). Leishmaniasis: Media centre. Fact sheet N°375.
22. McGwire BS, Satoskar AR. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine; 107(1):7-14.*

23. Lawn, S. D., Whetham, J., Chiodini, P. L., Kanagalingam, J., Watson, J., Behrens, R. H., & Lockwood, D. N. J. (2004). New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. *Qjm*, 97(12), 781-788.
24. Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), 581-596.
25. Masmoudi, A., Dammak, A., Chaaben, H., Maalej, N., Akrouf, F., & Turki, H. (2008). Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatology online journal*, 14(8).
26. Masmoudi, A., Maalej, N., Boudaya, S., Turki, H., & Zahaf, A. (2006). [Adverse effects of intralesional Glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis]. *Medecine et maladies infectieuses*, 36(4), 226-228.
27. Iñiguez, S. R. (2004). *Leishmaniasis visceral en el criceto dorado: valoración de nuevas formulaciones de anfotericina B* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
28. Bogdan, C., & Rölinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, 28(1), 121-134.
29. Hall, B. F., & Joiner, K. A. (1991). Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Parasitology Today*, 7(3), 22-27.
30. Ruiz, J. H., & Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, 29(12), 671-678.
31. Lieke, T., Nylén, S., Eidsmo, L., McMaster, W. R., Mohammadi, A. M., Khamesipour, A., & Akuffo, H. (2008). Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clinical & Experimental Immunology*, 153(2), 221-230.
32. Olivier, M., Gregory, D. J., & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 293-305.

33. Von Stebut, E. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *European Journal of Dermatology*, 17(2), 115-122.
34. Gutiérrez-Kobeh, L., de Oyarzabal, E., Argueta, J., Wilkins, A., Salaiza, N., *et al.* (2013). Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitology research*, 112(4), 1755-1762.
35. Vargas-Inchaustegui, D. A., Tai, W., Xin, L., Hogg, A. E., Corry, D. B., & Soong, L. (2009). Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infection and immunity*, 77(7), 2948-2956.
36. Soong, L. (2008). Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4355-4360.
37. Ota, H., Takashima, Y., Matsumoto, Y., Hayashi, Y., & Matsumoto, Y. (2008). Pretreatment of Macrophages with the Combination of IFN- γ and IL-12 Induces Resistance to *Leishmania major* at the Early Phase of Infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(6), 589-593.
38. CHOI, B. S., & Kropf, P. (2009). Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization *ex vivo* and *in vitro*. *Parasite immunology*, 31(4), 199-209.
39. Wanasen, N., & Soong, L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic research*, 41(1), 15-25.
40. Abdian, N., Gholami, E., Zahedifard, F., Safaee, N., & Rafati, S. (2011). Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 127(3), 627-636.
41. Nagill, R., & Kaur, S. (2011). Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *International immunopharmacology*, 11(10), 1464-1488.
42. Singh, B., & Sundar, S. (2012). Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 30(26), 3834-3842.

43. Araújo, M. S. S., de Andrade, R. A., Sathler-Avelar, R., Magalhães, C. P., Carvalho, A. T., *et al.* (2011). Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 141(1), 64-75.
44. Datta, S., Adak, R., Chakraborty, P., Haldar, A. K., Bhattacharjee, S., *et al.* (2012). Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 130(1), 39-47.
45. Datta, S., Roy, S., & Manna, M. (2015). Therapy with radio-attenuated vaccine in experimental murine visceral leishmaniasis showed enhanced T cell and inducible nitric oxide synthase levels, suppressed tumor growth factor-beta production with higher expression of some signaling molecules. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(1), 36-42.
46. Gupta, R., Kushawaha, P. K., Tripathi, C. D. P., Sundar, S., & Dube, A. (2012). A novel recombinant *Leishmania donovani* p45, a partial coding region of methionine aminopeptidase, generates protective immunity by inducing a Th1 stimulatory response against experimental visceral leishmaniasis. *International journal for parasitology*, 42(5), 429-435.
47. DebRoy, S., Keenan, A. B., Ueno, N., Jeronimo, S. M., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2010). *Leishmania infantum chagasi*: a genome-based approach to identification of excreted/secreted proteins. *Experimental parasitology*, 126(4), 582-591.
48. Gour, J. K., Kumar, V., Singh, N., Bajpai, S., Pandey, H. P., & Singh, R. K. (2012). Identification of Th1-responsive leishmanial excretory–secretory antigens (LESAs). *Experimental parasitology*, 132(3), 355-361.
49. Garmory, H. S., Brown, K. A., & Titball, R. W. (2003). DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic vaccines and therapy*, 1(1), 2.
50. Seder, R. A., & Hill, A. V. (2000). Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, 406(6797), 793-798.

51. Gurunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L., & Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Current opinion in immunology*, 12(4), 442-447.
52. Tüting, T., Austyn, J., Storkus, W. J., & Falo Jr, L. D. (2000). The immunology of DNA vaccines. In *DNA Vaccines* (pp. 37-64). Humana Press.
53. Dupuis, M., Denis-Mize, K., Woo, C., Goldbeck, C., Selby, *et al.* (2000). Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2850-2858.
54. Neefjes, J., Jongsmá, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823-836.
55. Leone, P., Shin, E. C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., & Racanelli, V. (2013). MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(16), 1172-1187.
56. Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 8(8), 607-618.
57. Groettrup, M., Kirk, C. J., & Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 73-78.
58. Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2014). Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, 4(3), 862-884.
59. Mbonye, U. R., Wada, M., Rieke, C. J., Tang, H. Y., DeWitt, D. L., & Smith, W. L. (2006). The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35770-35778.
60. Brooks, P., Murray, R., Mason, G., Hendil, K., & RIVETT, A. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J*, 352, 611-615.

61. Kumar, R., & Engwerda, C. (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, 3(3), e13.
62. Yewdell, J. W. (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends in cell biology*, 11(7), 294-297.
63. Cheng, W. F., Hung, C. F., Chai, C. Y., Hsu, K. F., He, L., Ling, M., & Wu, T. C. (2001). Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *Journal of Clinical Investigation*, 108(5), 669.
64. Brodsky, J. L. (2012). Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell*, 151(6), 1163-1167.
65. Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., & Roy, S. (2005). Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and-resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1-and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 174(11), 7160-7171.
66. Basu, R., Roy, S., & Walden, P. (2007). HLA Class I—Restricted T Cell Epitopes of the Kinetoplastid Membrane Protein—11 Presented by *Leishmania donovani*—Infected Human Macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 195(9), 1373-1380.
67. Vivona, S., Gardy, J. L., Ramachandran, S., Brinkman, F. S., Raghava, G. P. S., Flower, D. R., & Filippini, F. (2008). Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends in biotechnology*, 26(4), 190-200.
68. Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*, 19(17), 2688-2691.
69. Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. (2000). The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine*; 18:2155.

70. Delogu G, Howard A, Collins FM, Morris SL. (2000). DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infect Immun*; 68:3097.
71. Yoshida S, Kashiwamura SI, Hosoya Y, Luo E, Matsuoka H, Ishii A, et al. (2000). Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of *Plasmodium berghei* sporozoite. *Biochem Biophys Res Commun*; 271:107.
72. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JI, Dang K, Oh K, Dentchev T, et al. (1999). Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. *J Interferon Cytokine Res*; 19:77.
73. Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. (1998). DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine*; 16:426.
74. Webster RG. (1999). Potential advantages of DNA immunization for influenza epidemic and pandemic planning. *Clin Infect Dis*; 28:225.
75. Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Matsuo K, Kurata T, et al. (2000). Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine*; 18:3214.
76. Han R, Cladel NM, Reed CA, Peng X, Budgeon LR, Pickel M, et al. (2000). DNA vaccination prevents and/or delays carcinoma development of papillomavirus-induced skin papillomas on rabbits. *J Virol*; 74:9712.
77. Walker PS, Scharon-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, et al. (1998). Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther*; 9:1899.
78. Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. (1998). Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med*; 4:1409.
79. Wize B, Garg N, Tarleton RL. (1998). Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*; 66:5073.

80. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. (2000). DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*; 68:4986.
81. Boyer JD, Ugen KE, Chattergoon M, Wang B, Shah A, Agadjanyan M, et al. (1997). DNA vaccination as anti-human immunodeficiency virus immunotherapy in infected chimpanzees. *J Infect Dis*; 176:1501.
82. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stravropoulos E, et al. (1999). Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*; 400:269.
83. Handman E, Noormohammadi AH, Curtis JM, Baldwin T, Sjolander A. (2000). Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*; 18:3011.
84. Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, Crosti MC, Ronchetti A, Moro M, et al. (2000). Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol*; 165:2651.
85. Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, et al. (2000). Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol*; 38:208.
86. Stevenson FK, Anderson KC. (2000). Preparing the ground for vaccination against multiple myeloma. *Immunol Today*; 21:170.
87. Coon B, An LL, Whitton JL, von Herrath MG. (1999) DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest*; 104:189.
88. von Herrath MG, Whitton JL. (2000). DNA vaccination to treat autoimmune diabetes. *Ann Med*; 32:285.
89. Seib, K. L., Zhao, X., & Rappuoli, R. (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(s5), 109-116.
90. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*; 408:740-5.

91. Tüting T, Austyn J, Storkus WJ, Falo LD. (1999). The immunology of DNA vaccines. In *Methods in molecular medicine*, Vol. 29. D. B. Lowrie, and R. R. Whalen, eds. Totowa: Humana Press Inc.; p. 37.
92. Nabors, G. S. (1997). Modulating ongoing Th2-cell responses in experimental leishmaniasis. *Parasitology today*, 13(2), 76-79.