

Ramos López Dayana.pdf
Jul 30, 2020
18672 palabras/101300 caracteres

Ramos López Dayana.pdf

Resumen de fuentes

12%

SIMILITUD GENERAL

1	www.facmed.unam.mx INTERNET	2%
2	www.slideshare.net INTERNET	1%
3	issuu.com INTERNET	<1%
4	www.researchgate.net INTERNET	<1%
5	sedici.unlp.edu.ar INTERNET	<1%
6	www.micarlino.es INTERNET	<1%
7	www.biblio.colpos.mx:8080 INTERNET	<1%
8	es.slideshare.net INTERNET	<1%
9	www.paho.org INTERNET	<1%
10	hdl.handle.net INTERNET	<1%
11	bdigital.unal.edu.co INTERNET	<1%
12	microshit669.tumblr.com INTERNET	<1%
13	patents.google.com INTERNET	<1%
14	repositorio.uam.es INTERNET	<1%

15	www.pharconfliu2016.com INTERNET	<1%
16	eprints.ucm.es INTERNET	<1%
17	repositorioubasibsi.uba.ar INTERNET	<1%
18	nos24.com INTERNET	<1%
19	docplayer.es INTERNET	<1%
20	revistaciencia.amc.edu.mx INTERNET	<1%
21	repositorio.upch.edu.pe INTERNET	<1%
22	lasaludfamiliar.com INTERNET	<1%
23	repositorio.uchile.cl INTERNET	<1%
24	repositorio.ufpe.br INTERNET	<1%
25	digital.cic.gba.gob.ar INTERNET	<1%
26	es.scribd.com INTERNET	<1%
27	www.scielo.sa.cr INTERNET	<1%
28	buleria.unileon.es INTERNET	<1%
29	Novaretti, Marcia C. Z., Azulamara S. Ruiz, Frederico L. Dulley, Pedro E. Dorlhiac-Llacer, and Dalton A. F. Chamone. "DetecÃ§Ã£o de Asp... CROSSREF	<1%
30	universianews.net INTERNET	<1%
31	dadun.unav.edu INTERNET	<1%
32	JOSEP AMADEU NAVARRO LÓPEZ. "Estudio preliminar de las interacciones del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y su huésped.", ... CONTENIDO PUBLICADO DE CROSSREF	<1%
33	doku.pub INTERNET	<1%

34	dugi-doc.udg.edu INTERNET	<1%
35	repositorio.ufc.br INTERNET	<1%
36	repository.eafit.edu.co INTERNET	<1%
37	rmf.smf.org.mx INTERNET	<1%
38	www.tdx.cat INTERNET	<1%
39	www.google.com INTERNET	<1%
40	ciencia.lasalle.edu.co INTERNET	<1%
41	ddd.uab.cat INTERNET	<1%
42	uvirtual.sld.cu INTERNET	<1%
43	www.ids.ac.uk INTERNET	<1%
44	www.llera.gob.mx INTERNET	<1%
45	www.tecnicapecuaria.org.mx INTERNET	<1%
46	A. Ferreras González, I. García Cuartero, A. Gato Díez, P. Ferreras Fernández. "Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis,..." CROSSREF	<1%
47	digital.csic.es INTERNET	<1%
48	dspace.udla.edu.ec INTERNET	<1%
49	eprints.uanl.mx INTERNET	<1%
50	hera.ugr.es INTERNET	<1%
51	repositorio.unb.br INTERNET	<1%
52	www.jove.com INTERNET	<1%

53	www.ocpi.cu INTERNET	<1%
54	E. García López, Ma. Salud Rubio Lozano, R. A. Alonso Morales, A. Gayosso Vazquez et al. " Amplificación múltiple de ADN para la dete... CROSSREF	<1%
55	EMMA PLANA ANDANI. "Selección y caracterización de anticuerpos recombinantes para fungicidas. Aplicación al desarrollo de técnica... CONTENIDO PUBLICADO DE CROSSREF	<1%
56	Mónica Paola Criollo Joaquin, Emmerik Motte, Max Salvatierra, Jorge Medina, Benoit Diringer, Gustavo Sandoval, Eric Mialhe. "Diseño y ... CROSSREF	<1%
57	core.ac.uk INTERNET	<1%
58	gaedisepsis.com.ar INTERNET	<1%
59	horizon.documentation.ird.fr INTERNET	<1%
60	pesquisa.bvsalud.org INTERNET	<1%
61	repositorio.lamolina.edu.pe INTERNET	<1%
62	www-ni.laprensa.com.ni INTERNET	<1%
63	www.antrop.uc.pt INTERNET	<1%
64	www.bioiberica.com INTERNET	<1%
65	www.ins.gob.pe INTERNET	<1%
66	www.oalib.com INTERNET	<1%
67	www.pdhculture.com INTERNET	<1%

Se excluyeron los depósitos de búsqueda:

- Trabajos entregados

Excluido del Informe de Similitud:

- Bibliografía
- Citas
- Citas
- Coincidencias menores (10 palabras o menos)

Se excluyeron las fuentes:

- Ninguno



19

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Efecto de la vacunación con el ADN del gen *LmxMBA* en ratones contra la
infección por *Leishmania major*.

TESIS

Que presenta:

Bact. DAYANA PAOLA RAMOS LÓPEZ

43

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de tesis:

D.C. José Luis Rosales Encina

Ciudad de México

Agosto, 2019

Este 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 de Estudios Avanzados del IPN y bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana y del Dr. Marco Antonio Vega López.

**Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Becario No.869191)**

Agradecimientos

Al CINVESTAV y al DIPM por haber sido parte de su selecto grupo de estudiantes y al Conacyt por la beca otorgada durante estos dos años.

Al Dr José Luis Rosales por haberme aceptado en su laboratorio, por su paciencia y dedicación por su todo el apoyo brindado a lo largo de este proceso. A mis asesores, la Dra Patricia Talamás y al Dr. Marco Vega por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo.

A la Dra Ana Lorena, porque fue un apoyo para mí en los momentos más difíciles que tuve que afrontar.

A Lidia Baylon y Patricia Espíritu, auxiliares del lab. 7 por todos sus consejos y por guiarme en los experimentos. Fueron muy pacientes y me apoyaron en todo momento desde que entre al laboratorio.

A mi familia, mi papá quien me dio sus alas para que yo volar, mi tía Yaneth quien ha sido como mi madre, a mis abuelos maternos y a mi abuela paterna. Son mi razón de ser y no tendré como pagarles el sacrificio que han hecho por mí. A mi madre Adriana por haberme prestado el dinero para viajar a México.

A mi novio, Abraham Villagómez por todo su amor, por su comprensión, por ser mi polo a tierra y por haber estado conmigo en los momentos más duros que la vida me ha hecho afrontar desde que llegué a México, por ser el mejor amigo que he tenido y por ser tan incondicional. También agradezco a su familia, a doña Rosalía, a Don Alejandro y a Gaby, por el apoyo dado.

A mis compañeros del Lab. 7. A María Angelica Burgos, por guiarme en los experimentos, a Gandhi Vázquez y a Emilio alias Emiliano compañero de generación y amigo por haber hecho de mi estadía en el lab más amena.

67 A todas las personas que conocí en el camino y se han ganado un lugar en mi corazón y en mis pensamientos. Dania, Laura, Diana, Rafa, Pedro, lo quiero con todo mi corazón. A Jesús alias el cubano, a Fabiana, a Manolo por haber sido tan incondicionales conmigo. A doña Paty por que se ha convertido en una gran amiga.

A todos muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. GENERALIDADES DEL PARÁSITO	13
2.1. Clasificación taxonómica	13
2.2. Morfología	13
3. LEISHMANIASIS	15
3.1. Vector	15
3.2. Formas clínicas de la Leishmaniasis	16
3.2.1. Leishmaniasis visceral (LV) ó kala-azar	16
3.2.2. Leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK)	17
3.2.3. Leishmaniasis cutánea (LC)	17
3.2.4. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	18
3.3. Epidemiología	18
3.4. Tratamiento	19
4. RESPUESTA INMUNE	20
5. VACUNAS	22
5.1. Vacunas de primera generación	23
5.2. Vacunas de segunda generación	23
5.3. Vacunas de tercera generación	24
5.4. Vacunología reversa	24
7. ANTECEDENTES	26
8. JUSTIFICACIÓN	28
8.1. HIPÓTESIS	28
9. OBJETIVOS	29
9.1. Objetivo general	29
9.2. Objetivos específicos	29
10. MATERIALES Y MÉTODOS	30
10. 1. Material biológico	30

10.2. Amplificación y clonación del gen MBA a partir de ADN genómico de <i>Leishmania</i> mayor en el plásmido pVAX1.....	30
10.2.1. Extracción de ADN de <i>Leishmania</i> mayor	30
10.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
10.2.3. Clonación del gen MBA a partir de ADN genómico de <i>Leishmania</i> mayor.....	32
10.2.4. Purificación de ADN plasmídico.....	33
10.2.5. Subclonación del gen MBA en el plásmido pVAX1	34
10.2.6. Reacción de secuenciación.....	35
10.3. Clonación y purificación de la proteína recombinante	35
10.4. Electroforesis e inmunotransferencia	37
10.5. Determinación de anticuerpos por ELISA	37
10.6. Esquema de inmunización.....	38
10.6.1. Inmunización con ADN.....	38
10.7. Efecto profiláctico de la vacuna de ADN en ratones infectados con <i>L. mayor</i>	38
10.8. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN en ratones infectados con <i>L. mayor</i>	38
11. RESULTADOS.....	40
11.1 Selección del gen MBA por análisis bioinformático	40
11.2. Amplificación y clonación del gen <i>LmxMBA</i> a partir del ADN genómico de <i>Leishmania mexicana</i> en el plásmido pVAX1.	44
11.3. Evaluación de la evolución de la lesión ocasionada <i>L. mayor</i> en el cojinete plantar de ratones.....	47
11.4. Efecto profiláctico de la vacuna de ADN que codifica para el gen MBA de <i>Leishmania mexicana</i> contra la infección por <i>Leishmania mayor</i>	49
11.5. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN que codifica para el gen MBA de <i>Leishmania mexicana</i> en ratones infectados con <i>Leishmania mayor</i>	51
11.6. Expresión y purificación de la proteína recombinante.	53
11.6.1. Purificación de la proteína recombinante MBA de <i>L. mexicana</i>	53
11.6.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante MBA de <i>L. mayor</i>	54
11.7. Determinación de anticuerpos obtenidos por inmunización con el ADN plasmídico pVAX1:: <i>LmxMBA</i>	57
DISCUSIÓN	63
13. CONCLUSIONES.....	68
14. PERSPECTIVAS.....	69
BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

La leishmaniasis incluye una multitud de enfermedades infecciosas producida por diferentes especies de protozoarios del género *Leishmania*, pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, y transmitida por la picadura de insectos dípteros hematófagos. De las formas clínicas de la enfermedad, la leishmaniasis cutánea es la forma más común. La vacunación sigue siendo la oportunidad más apropiada para la prevención y tratamiento seguro de todas las formas de la enfermedad, por lo que el desarrollo de una vacuna segura, eficaz y asequible contra *Leishmania* es una de las principales prioridades mundiales de salud pública. La secuenciación del genoma y la traducción de su proteoma condujeron al advenimiento de la vacunología reversa.

En nuestro laboratorio, basados en el enfoque de vacunología reversa, se seleccionó el gen MBA de *L. mexicana* como posible candidato a vacuna. Burgos-Reyes en su tesis de maestría, evidenció el efecto terapéutico y profiláctico generado por la vacunación con ADN en animales de experimentación infectados con *L. mexicana*. Ya que este gen está altamente conservado entre las especies de *Leishmania*, se evaluó el efecto terapéutico y profiláctico inducido por la vacuna de ADN que codifica para la proteína LmxMBA en ratones hembras BALB/c.

Como resultados tenemos que la vacunación con el ADN recombinante del gen LmxMBA, no protegió contra la infección de *L. major* en ratones inmunizados previamente y 60 días después de la infección los animales desarrollaron la lesión en el cojínete plantar, es decir, no se obtuvo un efecto profiláctico. Al evaluar el efecto terapéutico, la inmunización con el ADN recombinante del gen LmxMBA en los ratones infectados con *L. major* no retrasó el desarrollo de la lesión en comparación con los animales control. Al realizar los ensayos de ELISA, se evidenció que los títulos de anticuerpos generados contra la proteína rLmxMBA codificada por el plásmido no son los mismos que los generados por la infección natural con los parásitos de *L. major*. Con estos resultados podemos concluir que la protección contra la leishmaniasis está dada por anticuerpos antígenos específicos los antígenos de cada especie son inmunológicamente diferentes.

7

ABSTRACT

31 Leishmaniasis includes a multitude of infectious diseases caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*, belonging to the *Trypanosomatidae* family, and transmitted by the bite of hematophagous diptera insects. Of the clinical forms of the disease, cutaneous leishmaniasis is the most common form.

15 Vaccination remains the most appropriate opportunity for the prevention and safe treatment of all forms of the disease, so the development of a safe, effective and affordable vaccine against *Leishmania* is one of the world's top public health priorities. Genome sequencing and translation of its proteome led to the advent of reverse vaccinology.

In our laboratory, based on the reverse vaccinology approach, the MBA gene of *L. mexicana* was selected as a possible vaccine candidate. Burgos-Reyes, evidenced the therapeutic and prophylactic effect generated by vaccination with DNA in experimental animals infected with *L. mexicana*. Since this gene is highly conserved among *Leishmania* species, the therapeutic and prophylactic effect induced by a DNA vaccine encoding the LmxMBA protein in female BALB/c mice was evaluated.

As results we have that vaccination with the recombinant DNA of the LmxMBA gene, did not protect against infection *L. major* in mice previously immunized and 60 days after infection the animals developed the plantar bearing lesion, that is, it was not obtained a prophylactic effect. When evaluating the therapeutic effect, the immunization of *L. major* infected mice with the recombinant DNA of the LmxMBA gene did not delay the development of the lesion compared to the control animals. When performing an ELISA assay, it was evident that the antibody titers generated against the rLmxMBA protein encoded by the plasmid were not the same as those generated by the natural infection by *L. major* parasites.

With these results we can conclude that protection against leishmaniasis is given by specific antigen antibodies as results of immunologically different antigens of each species.

8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW	42
Figura 2. Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína MBA	43
Figura 3. Purificación del ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA	46
Figura 4. Amplificación y clonación del gen <i>LmjMBA</i> en el vector pCR4-TOPO	47
Figura 5. Subclonación del fragmento <i>LmjMBA</i> en el vector pVAX1	47
Figura 6. Crecimiento del cojinete plantar en ratones infectados por <i>L. major</i> .	49
Figura 7. Efecto profiláctico de la vacunación con el ADN que codifica para el gen <i>LmxMBA</i> contra la infección de <i>Leishmania major</i> .	51
Figura 8. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN que codifica para el gen <i>LmxMBA</i> contra la infección de <i>Leishmania major</i> .	53
Figura 9. Purificación de la proteína recombinante <i>rLmxMBA</i> .	54
Figura 10. Subclonación del fragmento <i>rLmjMBA</i> en el vector pRSETA.	56
Figura 11. Expresión de la proteína recombinante MBA de <i>L. major</i> .	56
Figura 12. Purificación de la proteína recombinante <i>rLmjMBA</i> .	57
Figura 13. Determinación de anticuerpos anti- <i>LmxMBA</i> en ratones inmunizados.	58
Figura 14. Determinación de anticuerpos anti-Lmx por ensayos de ELISA en vacunación profiláctica.	60
Figura 15. Determinación de anticuerpos anti-Lmx por ensayos de ELISA en vacunación terapéutica.	61
Figura 16. Determinación de anticuerpos anti-MBA por ensayos de ELISA en vacunación profiláctica.	62

Figura 17. Determinación de anticuerpos anti-MBA por ensayos de ELISA en vacunación terapéutica. **63**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de MBA.	32
Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos MBA.	33
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de MBA para la proteína recombinante.	36
Tabla 4. Predicción de epítomos para linfocitos T y linfocitos B de las especies de <i>Leishmania mexicana</i> y <i>Leishmania major</i> .	60

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis incluye una multitud de enfermedades infecciosas producida por diferentes especies de protozoarios del género *Leishmania* pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* y transmitida por la picadura de insectos dípteros hematófagos que corresponden a diferentes especies de flebótomos en el viejo mundo y *Lutzomyias* en el nuevo mundo que plantean serios problemas de salud pública en las regiones endémicas de 98 países. De las dos formas principales de tales infecciones, conocidas como leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis cutánea (LC), esta última es la forma más común. Las leishmaniasis son enfermedades multifactoriales cuyos resultados están influenciados por las interacciones dinámicas del parásito, su reservorio (s), su vector y, finalmente, el sistema inmune de su hospedero humano¹⁻².

Actualmente esta enfermedad no tiene cura y el tratamiento existente se basa en la quimioterapia que depende de la administración de medicamentos con un alto costo y efectos secundarios graves, como toxicidad, cumplimiento deficiente e inducción rápida de resistencia en áreas endémicas. La vacunación sigue siendo una alternativa viable para la prevención y tratamiento de todas las formas de la enfermedad, por lo que el desarrollo de una vacuna contra *Leishmania* segura, eficaz y asequible es una de las principales prioridades y sigue siendo el enfoque más prometedor.

2. GENERALIDADES DEL PARÁSITO

2.1. Clasificación taxonómica

2 El género de *Leishmania* spp pertenece al filo Mastigosphora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae. Comprende unas 30 especies morfológicamente similares, de las cuales 20 son responsables de las enfermedades en humanos. El género *Leishmania* tiene 40 dos subgéneros: *Leishmania* (en el Nuevo y Viejo mundo) y *Leishmania* o *Viannia* (solo en el viejo mundo)³.

3 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. colombiensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi* y *L. naiffi*. En el complejo de *L. guyanensis* se encuentran: *L. guyanensis* y *L. panamensis*. En este subgénero 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 el 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. garnham*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi*⁴.

2.2. Morfología

Leishmania es un protozoo intracelular obligado dimórfico; en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel)⁵. Este parásito presenta dos estadios celulares; el promastigote, es 8 elongado, extracelular, se desarrolla y se multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Mide entre 2 10-20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15-25 μm ; presenta un gran 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. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar⁵.

El amastigote es la forma replicativa, redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en los fagolisosomas de los fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel. Mide de 2-4 μm ; con la tinción de Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que se une al cinetoplasto y el cuerpo basal, éste último es apenas un punto visible. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con ADN 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 kinetoplastida⁵.

2.3. Ciclo de vida

Los parásitos de *Leishmania* tienen un ciclo de vida complejo que involucra hospedadores vertebrados e invertebrados y dos etapas de desarrollo: los promastigotes son la forma proliferativa y se encuentran en el lumen del intestino de la mosca hembra y los amastigotes, son la forma proliferativa que se encuentra dentro de varios tipos de células hospederas de los mamíferos⁶.

La infección comienza cuando un *Phlebotomine* pica a un ser humano u otro hospedero mamífero para alimentarse de la sangre. Durante la picadura, el insecto inyecta en la saliva sustancias que evitan la coagulación de la sangre⁶. Después de la ingestión sanguínea, los promastigotes metacíclicos se liberan y entran en la piel del hospedero a través de la regurgitación⁷. Una picadura simple libera sustancias que inducen la infiltración rápida de neutrófilos y el reclutamiento sustancial de macrófagos en la piel⁸. Los parásitos primero invaden a los neutrófilos, que se reclutan rápidamente en el sitio de la picadura, y después a los macrófagos. Sin

embargo, otros tipos de células, como las células de Langerhans y los fibroblastos, también pueden ser infectados⁸.

Se cree que los neutrófilos juegan un papel importante actuando como un "Caballo de Troya"⁹, mientras que los macrófagos son importantes para el establecimiento y diseminación de la infección. El parásito se adhiere a la superficie de la célula del hospedero a través del flagelo o del cuerpo celular. Esta adhesión implica el reconocimiento de moléculas expuestas en la superficie del parásito, como los lipofosfoglicanos (GLP)⁸ o la glicoproteína de 63 KDa (GP63)⁹. Estas moléculas se unen a diferentes receptores que se encuentran en la superficie de los macrófagos, incluidos los receptores del complemento (CR1 y CR3), los receptores de manosa (MR) y los receptores de fibronectina (FnR)¹⁰. El proceso de fagocitosis comienza con la formación de pseudópodos. Por lo tanto, el parásito se adhiere a la superficie de los macrófagos y luego se internaliza en una vacuola conocida como vacuola parasitófora (VP). En la VP, el promastigote metacíclico se transforma en amastigote; a esto le sigue la fusión de los lisosomas de la célula hospedera con la PV¹¹. Algunos de los amastigotes se adhieren a la membrana de la vacuola, mientras que otros permanecen libres y comienzan a replicarse dentro de la VP. Luego de una intensa multiplicación, la membrana del macrófago se rompe, liberando los amastigotes en el tejido; estos amastigotes pueden invadir nuevos macrófagos o ser ingeridos por el insecto durante su alimentación sanguínea.

3. LEISHMANIASIS

3.1. Vector

Entre más de 900 especies de moscas de arena registradas, solo 98 son vectores probados de la leishmaniasis humana, 42 especies de *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y 56 especies de *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Hoy se conocen 46 especies de *Lutzomyia* en México, de las cuales se han identificado 11 especies antropofílicas, pero sólo *Lu. olmeca* y *Lu. diabólica* ha sido demostrados como transmisoras del parásito *Leishmania*. El tamaño de estos dípteros oscila entre 1,5

y 4 mm; poseen un cuerpo de color gris amarillento o amarillo pálido cubierto de pelos que recuerda al de una polilla sus alas son erectas en forma de "V", y la probóscide o trompa es más larga que la cabeza. Presentan mandíbulas y piezas bucales adaptadas para absorber sangre, tienen antenas formados por 6 segmentos, el radio del ala presenta 5 ramas y las hembras tienen dos espermatecas¹².

En México se han reportado 39 especies de *Phlebotominae*, de las cuales solo cuatro están incluidas dentro de las especies confirmadas o bajo sospecha de ser vectores: *Lu. longipalpis*, *Lu. olmeca*, *Lu. panamensis* y *Lu. ylephiletor*. Además, se logró el aislamiento de *L. mexicana* en el flebótomo *L. anthophora*¹².

3.2. Formas clínicas de la Leishmaniasis

3.2.1. Leishmaniasis visceral (LV) ó kala-azar

La ¹⁴leishmaniasis visceral (LV, también conocida como kala-azar) resulta de la infección de fagocitos dentro del sistema reticuloendotelial debido a la metástasis de macrófagos infectados por los parásitos desde el sitio inicial de la infección cutánea. En el Viejo Mundo, la LV es causada por *Leishmania donovani* (en las regiones de India, Pakistán, China y África) y *Leishmania infantum* (en la región del Mediterráneo). ²¹En el Nuevo Mundo, la LV también es causada por *L. infantum* (también conocida como *Leishmania chagasi* o *L. infantum chagasi*), que se encuentra principalmente en Brasil. La proliferación de ²⁸parásitos en el hígado, el bazo y la médula ósea de pacientes con LV da lugar a una hepatoesplenomegalia progresiva y supresión de la médula ósea. A menos que sean tratados, los pacientes desarrollan pancitopenia e inmunosupresión y son propensos a las superinfecciones con otros microbios. Sin terapia, los pacientes con LV eventualmente sucumbirán a su enfermedad. Las personas coinfectadas con VIH tienen una susceptibilidad particular al desarrollo de presentaciones atípicas, y el aumento de la gravedad de la LV y el desarrollo de LV en pacientes con VIH es una enfermedad definitoria del SIDA¹³. Esto probablemente se deba a los efectos de desregulación de ambos agentes en el sistema inmunológico del hospedero¹⁴.

3.2.2. Leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK)

En un subgrupo de pacientes tratados exitosamente por VL, y que permanecen asintomáticos durante meses o años, desarrollan una proliferación ⁴⁶ fulminante y progresiva de parásitos en la piel que dan lugar a lesiones maculares, maculopapulares o nodulares difusas. La leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK) ocurre principalmente en la India y Sudán en pacientes infectados con *L. donovani*¹⁵. En Sudán, la LDPK puede surgir hasta en el 50% de los pacientes y ocurre antes que, en los pacientes en la India, donde tiene una incidencia de ~5-10% en 2 a 3 años después de la eliminación de la LV. La patogenia de la LDPK no se comprende completamente, pero parece estar relacionada con una respuesta inmune agresiva del hospedero impulsada por interferón γ (IFN- γ) generada contra parásitos dérmicos persistentes¹⁶.

⁴⁸ 3.2.3. Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es la forma ²⁴ menos severa de la enfermedad y es causada por varias especies como *L. major* y *L. tropica* en el Viejo Mundo y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* en varias regiones de América Central y Sudamérica¹⁶. La enfermedad cutánea simple se presenta como lesiones ulcerativas o nodulares singulares en o cerca del sitio de exposición al insecto. Por lo general, se encuentran en áreas del cuerpo descubiertas, como la ⁶² cara, los antebrazos y la parte inferior de las piernas, y evolucionan durante semanas o meses. Existe una variación de LC, conocida como Leishmaniasis cutánea difusa causada por *L. amazonensis*, las lesiones son nodulares, de tamaño variable, que aparecen en varios lugares, a menudo lejos de la zona de exposición a los insectos. La resolución de las lesiones cutáneas a menudo puede ser ² acelerada por la administración de medicamentos. La LC es conocida en México como "úlceras de los chicleiros" debido a que fue encontrada en trabajadores que extraían la goma del árbol del chicle y con frecuencia se observaba afectando el pabellón auricular, de curso progresivo y mutilante¹⁷.

3.2.4. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La LMC es causada por *L. braziliensis*, que puede deberse a la extensión o metástasis de parásitos de la enfermedad cutánea local al tejido mucocutáneo. LMC se puede presentar meses o años después de la resolución de las lesiones primarias. Está es a menudo una infección que resulta en la destrucción local crónica de los tejidos de la nariz, la faringe, los párpados de la boca y puede progresar para afectar la función respiratoria. La patogenia subyacente que resulta en LMC no se conoce bien pero probablemente sea el resultado de una compleja interacción de factores del hospedero y del parásito¹⁸. La enfermedad a menudo es refractaria a la quimioterapia y los pacientes generalmente mueren a causa de una superinfección secundaria y desnutrición. La LMC se encuentra en países de América del Sur, con la mayoría de las enfermedades encontradas en Brasil, Perú y Bolivia, pero también se reportan en menor grado en Colombia, Ecuador, Paraguay y Venezuela¹⁹.

3.3. Epidemiología

¹⁸ En el mundo, se estima que cada año se producen entre 0,9 a 1,6 millones de nuevos casos de leishmaniasis, y entre 20.000 y 30.000 defunciones. En las Américas, actualmente se registra un promedio de 56.000 casos de LC y LMC y, 3.800 casos de LV al año.¹ Las zonas geográficas situadas por debajo de los 1750 metros sobre el nivel del mar, con clima cálido, humedad relativa alta y temperatura media entre 25-30 °C presentan las mejores condiciones para la transmisión de la enfermedad cutánea y la proliferación de focos en bosques tropicales donde aún es frecuente la presencia de reservorios y vectores, en tanto que los bosques secos tropicales son el hábitat preferido para la LV. Actúan como reservorios los marsupiales, roedores, zorros, animales peridomésticos; los perros tienen gran importancia por su estrecha relación con el humano¹⁻³.

⁹ LC se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México). En la región, 27% de casos de LC se presentan en zonas fronterizas².

1 Cabe mencionar que se pueden encontrar otras especies de *Leishmania* en México debido a la inmigración. Quintana Roo, Chiapas y Campeche comparten fronteras con Guatemala, donde *L. panamensis* y *L. guyanensis* son endémicas¹.

3.4. Tratamiento

Existen varias terapias para las diferentes de formas clínicas de la leishmaniasis y las preferencias para el tratamiento de primera y segunda línea varían según el tipo de enfermedad y, a menudo, están guiadas por la práctica regional. El antimonio pentavalente ha sido considerado el pilar de la terapia en la leishmaniasis durante décadas; sin embargo, este agente tiene múltiple toxicidad y está aumentando su ineficacia debido al desarrollo de resistencia por parte de los parásitos¹⁹.

Un agente de elección para la mayoría de las formas de leishmaniasis es el uso sistémico de antimonio pentavalente (Sb), que está presente en el antimonato de meglumina (nombre comercial 'Glucantime') o estibogluconato de sodio (nombre comercial 'Pentostam'). El mecanismo de acción preciso del Sb en la leishmaniasis no se conoce bien, pero es probablemente multifactorial y actúa directamente sobre los procesos moleculares del parásito, además de influir en la actividad microbicida de los macrófagos. Para uso sistémico, estos compuestos pueden administrarse por vía intravenosa (iv) o intramuscularmente (im), y también se pueden usar por vía intralesional (il). Los efectos secundarios son comunes en la terapia sistémica de antimonio, el más grave es la cardiotoxicidad (arritmias, prolongación del intervalo QT y muerte súbita), pero se producen otras múltiples (elevación de las enzimas hepáticas y de las enzimas pancreáticas, pancitopenia y anomalías en los electrolitos), que requieren un control cuidadoso de los pacientes durante el curso de la terapia²⁰.

La anfotericina B es un eficaz anti leishmanial que funciona mediante la unión a la membrana de ergosterol en los hongos generando la inestabilidad de misma²¹. La anfotericina B liposomal se usa típicamente en una dosis de 2.5 a 5 mg/kg/día y esta formulación reduce la duración total del tratamiento a la mitad de la forma no liposomal, estas deben administrarse para todas las formas clínicas de las

leishmaniasis. Los efectos secundarios comunes de la anfotericina B son la insuficiencia renal y las anomalías electrolíticas, que son menos frecuentes con la forma liposomal; sin embargo, esta formulación es más costosa, lo que limita su uso generalizado²¹.

Existen otros medicamentos para el tratamiento de las leishmaniasis como lo son; la paromomicina el cual es un antibiótico aminoglucósido que actúa bloqueando la síntesis de proteínas mediante la unión al ARN ribosomal 16S. En la LV, se usa mediante administración sistémica (15 mg/kg) por 21 días en la LV en la India o en combinación con anfotericina B liposomal en la India o África oriental. La pentamidina (nombres comerciales 'Pentacarinat' y 'Pentam') interfiere con la biosíntesis de macromoléculas como el ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas y la alquil-fosfololina-miltefosina (nombres comerciales 'Impavido' y 'Miltefex') es el único agente oral que se usa para la LV de la India y África Oriental tanto en niños como en adultos donde la dosis se basa en el peso²²⁻²⁶.

Aunque, los azoles (inhibidores de la síntesis de ergosterol) tienen actividad parasitostática *in vitro* contra una variedad de especies leishmaniales, no se ha justificado que sean tan efectivos como otros agentes para uso clínico. Se ha demostrado que el ketoconazol oral (nombre comercial 'Nizoral') (600 mg por vía oral diariamente durante 28 a 30 días) y fluconazol (nombre comercial 'Diflucan') (una dosis diaria de 200 mg por vía oral durante 6 semanas) aceleran la curación de las lesiones LC causadas por *L. mexicana*²⁷ y *L. major*²⁸ respectivamente.

2 4. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* inicia con la respuesta innata. Los receptores TLR2 (*Toll-like receptor 2*), presentes en macrófagos, células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK) reconocen moléculas en la superficie del parásito, tales como el LPG o la GP63 e inducen la producción de citocinas proinflamatorias, así como de moléculas coestimuladoras. El macrófago cubre un papel triple en la enfermedad: es una célula hospedera, célula presentadora de antígenos que activan las células T específicas, y célula efectora cuya eficacia leishmanicida depende de la activación por parte de las citocinas²⁹.

1 El LPG es uno de los principales glicoconjugados de superficie de los promastigotes. Protege a *Leishmania* al inhibir la maduración del fagosoma, mediante el secuestro de aniones superóxido y radicales hidroxilos y la inhibición de la señalización eficaz de la proteína cinasa-C, necesaria para el estallido respiratorio. Esto le permite al parásito sobrevivir dentro de la VP hasta su diferenciación en amastigotes, quienes pueden subsistir y dividirse en compartimentos ácidos²⁹. Los LPGs también están involucrados en la sobrevivencia de los promastigotes en el vector. La metaloproteasa dependiente de zinc, conocida como GP63 o leishmanolisina, permite que el promastigote resista la lisis mediada por el complemento y favorece su ingreso al macrófago. Dentro de esta célula hospedera, GP63 es responsable de la activación de las tirosina-fosfatasas que dan lugar a la alteración de las vías de cinasa JAK, MAP, e IRAK-1³⁰. En el núcleo, está involucrada en la inactivación de factores de transcripción tales como AP-1 y NF- κ B. La respuesta celular es importante en el control de la infección, dado que el desarrollo de una respuesta específica de Th1, basada en la producción de citocinas, puede proteger a los hospederos mamíferos de la infección por los parásitos, mientras que una respuesta Th2, cebada por la producción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros, apoya la persistencia de parásitos y puede causar una enfermedad activa^{29, 30}.

Para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en los fenotipos tanto Th1 como Th2, los antígenos se presentan a células T CD4+ vírgenes por las DC. La interacción de moléculas coestimuladoras con sus respectivos ligandos (CD40-CD40L, OX40-OX40L y/o CD80-CTLA4/CD28), junto con el entorno de citocinas local, promueve la diferenciación de las células T naïve en células Th1 secretando IFN- γ o células Th2 secretando IL-4. En el desarrollo de tipo Th1, ciertos patógenos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) desencadenan células presentadoras de antígeno, a través de TLR, para secretar IL-12, que promueve la diferenciación de células T naïve en células Th1 secretando IFN- γ . El transductor de señal y el activador de transcripción 4 (STAT4) y STAT1 se activan por IL-12 e IFN- γ , respectivamente. La señalización de IFN- γ en macrófagos infectados promueve la expresión de óxido nítrico (NO) sintasa inducible (iNOS, NOS2) y la

producción de NO que, junto con especies de oxígeno reactivo (ROS) generadas durante la fagocitosis, son esenciales para matar parásitos intracelulares. Sin embargo, algunas especies de *Leishmania* como *L. amazonensis* son resistentes a la muerte mediada por IFN- γ , y el control de los parásitos durante las primeras etapas de la infección en ratones es independiente de esta citocina. Además del IFN- γ , otras citocinas inflamatorias, como el TNF, pueden activar los macrófagos infectados de forma autocrina para producir NO³⁰ y generar la muerte de los parásitos dentro del macrófago^{29,30}.

Por el contrario, en el desarrollo de células de tipo Th2 *Leishmania* tiene la capacidad de inhibir la producción de IL-12 en las células infectadas, lo que da como resultado una vía predeterminada de diferenciación de linfocitos T en Th2 que secreta IL-4, IL-10, IL-13 entre otras. Durante la infección, estas citocinas están involucradas en impedir la proliferación de los fagocitos al sitio de infección y en el bloqueo de vías de señalización para la activación del macrófago y la consecuente eliminación de los parásitos intracelulares, lo que favorece la supervivencia del parásito en el interior de los macrófagos y a un fenotipo no curativo³⁰.

Debido a estos hechos, se han desarrollado estudios para identificar nuevos candidatos para ser utilizados en la prevención de la leishmaniasis.³¹ Sin embargo, a pesar de la amplia gama de trabajos llevados a cabo durante un período bastante largo, no existe una vacuna confiable disponible para prevenir esta enfermedad.

5. VACUNAS

La vacuna se considera uno de los logros más importantes de la medicina. La ²²vacunación es la administración de material antigénico para estimular el sistema inmune de un individuo para desarrollar inmunidad adaptativa a un patógeno.³² Actualmente, existen tres tipos principales de vacunas: vacunas convencionales o de primera generación, vacunas recombinantes o de segunda generación, y ADN de plásmido (pADN) o vacunas de tercera generación³³.

16 5.1. Vacunas de primera generación

Las vacunas compuestas de parásitos muertos se han administrado en ensayos clínicos aleatorizados con fines profilácticos³⁶⁻³⁷. Las vacunas convencionales se basan en microorganismos inactivados, microorganismos atenuados y en subunidades de patógenos como toxinas, polisacáridos y glicoconjugados^{38,39}. Investigadores iraníes en el instituto Razi indagaron la eficacia de *L. major* tratada en autoclave en su formulación (ALM). Las investigaciones mencionadas confirmaron que ALM no promueve la inmunidad por sí sola⁴⁰. Estudios posteriores realizados con la ayuda de adyuvantes evidenciaron una mejor respuesta inmunitaria.

5.2. Vacunas de segunda generación

La mayoría de los estudios de vacunas se enfocan en subunidades que comprenden proteínas recombinantes o poli-proteínas producidas por clonación de ADN. La segunda generación de vacunas refinadas, tales como proteínas recombinantes asociadas con adyuvantes o expresadas en otros vectores microbianos, mostró una aplicación más factible para la vacunación masiva^{40, 41}. La naturaleza recombinante de las vacunas implica que facilitan su accesibilidad a gran escala y una producción rentable. Además, las respuestas derivadas de las vacunas de segunda generación pueden fortalecerse y refinarse mediante el empleo de un adyuvante pertinente⁴¹.

Contra *Leishmania* se han desarrollado vacunas de segunda generación basadas en proteínas recombinantes como la GP63, la cual lleva a cabo una actividad catalítica como metaloproteínasa que puede proteger a *Leishmania* en los macrófagos^{42, 43}. También, se ha evaluado un homólogo en *Leishmania* para receptores de cinasa C activada (LACK), este gen tiene un papel inmunopatógeno en la infección murina por *L. major*, se evidenció que el antígeno LACK potencializa la producción de IL-10, pero regula negativamente la producción de IFN- γ ⁴³.

Aunque las vacunas recombinantes basadas en proteínas han logrado algunos grados de protección en ratones y perros, se han enfrentado a problemas complicados en el proceso de obtener autorización de comercialización

particularmente en medicina humana debido a la necesidad indispensable de un adyuvante⁴⁴. La vacunación con ADN requiere una expresión transgénica exitosa, que depende de su administración al núcleo de la célula. Esto no es un logro simple, ya que las nucleasas extracelulares y séricas degradan la gran mayoría del ADN inyectado, dejando solo una pequeña fracción de constructos intactos disponibles para la captación de ADN. De hecho, la captación celular no garantiza la transfección, ya que menos del 10% del ADN transferido alguna vez llega al núcleo, mientras que la mayor parte se degrada o se asocia con componentes citoplásmicos.⁴⁵

5.3. Vacunas de tercera generación

La vacunación con ADN es la introducción directa de material genético en un hospedero vivo. Se lleva a cabo con un plásmido (que contiene ADN inmunógeno de interés) empleando alguna vía de administración ya sea intramuscular, intradérmica, por vía oral o bombardeo de partículas. El enfoque de la vacuna de ADN es similar a los mecanismos de ataque viral dentro del cuerpo. Las vacunas de ADN desnudo son extremadamente seguras, ya que no contienen ningún organismo patógeno que pueda revertir en virulencia y también han logrado un éxito considerable, especialmente con pistola génica en roedores. Los ensayos empleando este tipo de vacunas contra *Leishmania* fueron usando el antígeno LACK cuyas inmunizaciones lograron un grado de defensa en ratones, sin embargo, solo confirieron una protección moderada en perros. Por el contrario, la vacunación con refuerzo primario que usa cisteína proteinasa A y antígenos de cisteína proteinasa B fue altamente protectora en ratones y perros, como una vacuna de ADN exitosa en modelos no murinos, sin embargo, en ensayos clínicos de fase III no previno de la infección al modelo canino^{44, 45}.

5.4. Vacunología reversa

Gracias a la disponibilidad de datos de secuencia para genomas completos, y al uso de enfoques bioinformáticos, la vacunología reversa (RV) selecciona proteínas que podrían ser candidatas potenciales para vacunas. Las ventajas de este enfoque

darían como resultado una formulación de vacuna rápida, identificar vacunas candidatas de microorganismos que no se podrían cultivar, y todo a costos reducidos en comparación con los enfoques convencionales. Hasta hace poco, el desarrollo de vacunas se asociaba con métodos convencionales, como los enfoques bioquímicos, inmunológicos y microbiológicos que utilizan la totalidad o parte de los patógenos. Con el advenimiento de las técnicas post-genómicas y la inmunoinformática para el análisis de datos del sistema inmune, la vacunología inversa se está convirtiendo en una herramienta útil para diseñar y desarrollar vacunas⁴⁶.

Por medio de esta tecnología se han logrado identificar en el genoma de *Leishmania* antígenos que tienen potencial inmunogénico y que podrían ser candidatos para una vacuna. El primero es el enfoque *in silico* que normalmente se centra en la predicción de epítomos de células T y B, análisis filogenético para la identificación de epítomos leishmaniales conservados de especies de *Leishmania* o la predicción de localización de proteínas/péptidos en el parásito. Muchos algoritmos se utilizan para predecir la afinidad de unión de epítomos peptídicos a moléculas MHC de clase I y II, y epítomos peptídicos lineales o discontinuos para células B. Básicamente, la vacunología inversa usa la inmunoinformática para el mapeo de epítomos en todo el genoma de un patógeno aplicando algoritmos predictivos que son capaces de pronosticar los epítomos peptídicos de las células T y B. Esta estrategia tiene muchas ventajas, la más importante es la disminución del tiempo y el costo necesarios para identificar candidatos potenciales para la vacuna⁴⁶⁻⁴⁸.

7. ANTECEDENTES

La inmunización exitosa que induce protección contra la leishmaniasis depende en gran medida de los adyuvantes que estimulan preferentemente el fenotipo Th1 de la respuesta inmune. Las vacunas de ADN inducen un espectro completo de respuestas inmunitarias que incluyen células T citolíticas, células T auxiliares y anticuerpos. La capacidad del ADN plasmídico que codifica el antígeno específico para inducir las células T tanto CD4 + como CD8 + sugiere que este enfoque será de particular utilidad para la protección contra enfermedades que requieren inmunidad mediada por células, como la leishmaniasis.

En un estudio realizado por Rafati, el potencial protector de un gen inmunogénico, conocido como SPase (señal peptidasa tipo I) de *L. major*, se evaluó utilizando tres estrategias de vacunación diferentes (ADN/ADN, proteína/proteína y ADN/proteína) contra la infección por *L. major*⁴⁹. Los resultados sugirieron que una estrategia de ADN/ADN indujo una mayor protección que los otros dos enfoques⁵⁰. La proteasa de membrana GP63 está presente en los promastigotes de todas las especies y es uno de los receptores parásitos para los anticuerpos monoclonales del hospedero. Los mutantes parásitos que carecen de la proteína son avirulentos e indujeron respuestas inmunitarias de tipo Th1 cuando se usaron como vacuna en modelos humanos⁵¹. BCG recombinante que expresa el antígeno de superficie de *Leishmania* GP63 indujo una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por *L. major* en ratones BALB/c⁵². De hecho, la GP63 o leishmanolisina fue el primer antígeno recombinante utilizado para vacunar contra la leishmaniasis. Por otra parte, Gurunathan *et al.*, han demostrado que el ADN que codifica para el antígeno LACK ejerce protección en ratones BALB/c y que dicha protección parece estar asociada con la producción de IL-12⁵³.

El antígeno TSA es una proteína de 22.1 kDa que se conserva en todas las especies de *Leishmania* y se expresa en amastigotes y promastigotes, LACK⁴² es una proteína de 36 kD que está altamente conservada entre diferentes especies del género y también se expresa tanto en promastigotes como en amastigotes del protozoario. En un estudio realizado por Maspi *et al.*, en el año 2017 se demostró que la

inmunización con proteína o ADN del antígeno TSA-LACK confirió una protección en ratones BALB/c infectados con *L. major* y redujo la progresión de la enfermedad y la carga de parásitos a través de aumento de la producción de IFN- γ y disminución en la producción de IL-4⁵⁴.

Por otra parte, Campos y colaboradores demostraron que un cóctel que contiene dos antígenos recombinantes leishmaniales (LmSTI1 y TSA) y la interleucina-12 (IL-12) como adyuvante induce una protección sólida en un modelo de leishmaniasis cutánea⁵⁵. Ya sea como genes individuales o en una construcción de varios genes en tándem, indujeron una protección igualmente sólida contra la infección por *L. major* en ratones BALB/c susceptibles inducida por células T del fenotipo Th1. Las respuestas de CD8, medidas por la actividad de los linfocitos T citotóxicos, se generaron después de la inmunización con ADN de TSA, pero no con ADN de LmSTI1. Curiosamente, la vacunación de ratones con ADN de TSA consistentemente indujo protección en un grado mucho mayor que el ADN de LmSTI1, apoyando así la idea de que las respuestas de CD8+ podrían ser un brazo accesorio importante de la respuesta inmune para la resistencia adquirida contra la leishmaniasis⁵⁵.

En nuestro laboratorio, basados en el enfoque de vacunología reversa, se seleccionó el gen MBA como posible candidato a vacuna evaluando el efecto terapéutico generado por la vacunación con ADN y con la proteína recombinante en ratones hembras BALB/c. Burgos-Reyes en su tesis de maestría, evidenció el efecto terapéutico generado por la vacunación de ADN en los ratones previamente infectados en el cojinete plantar con *L. mexicana*; al ser vacunados con el ADN plasmídico se observó una disminución de la lesión a los 45 días post-vacunación⁵⁶. Ya que este gen está altamente conservado entre las especies de *Leishmania*, se decidió comparar el efecto generado por ese mismo antígeno contra *L. major* debido a que ésta también es el agente causal de LC en el viejo mundo.

8. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis se considera una enfermedad tropical desatendida que tiene una amplia distribución mundial. El tratamiento de estas patologías se basa en una selección de compuestos terapéuticos, pero los fármacos disponibles son tóxicos y presentan graves efectos secundarios en los pacientes.

Con la ayuda de un análisis *in silico* se han podido identificar diversos antígenos candidatos a vacunas con un alto potencial inmunogénico. En nuestro laboratorio se identificó al gen *MBA* de *Leishmania* presente en los amastigotes y promastigotes del parásito y que está altamente conservado entre las especies de *Leishmania* y se pudo comprobar que inmunizando ratones con el ADN plasmídico recombinante después de un reto con *Leishmania mexicana* se revierten signos y síntomas clínicos de la LC.

Dado que *L. major* también es un agente causal de LC, se propone evaluar la respuesta inmune que se genera por el suministro de una vacuna de DNA que codifica para el gen *LmxMBA* en ratones BALB/c después de ser infectados con *L. major*.

8.1. HIPÓTESIS

La vacunación con el ADN plasmídico que codifica para el gen *LmxMBA* en ratones si ejerce un efecto contra la infección por *Leishmania major*.

9. OBJETIVOS

9.1. Objetivo general

Evaluar el efecto terapéutico y profiláctico contra *Leishmania major* inducido por una vacuna de ADN en ratones.

9.2. Objetivos específicos

1. Determinar la dosis infectiva de *L. major* en el cojinete plantar de ratones.
2. Evaluar el efecto terapéutico y profiláctico que tiene la vacuna de ADN (LmxMBA) en ratones ²⁸ contra la infección por *L. major*
3. Analizar la producción de anticuerpos que induce la vacuna de ADN (LmxMBA) en ratones.

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 la clonación del gen en los vectores pCR84-TOPO, pRSETA y pVAX1. Los cultivos bacterianos se mantuvieron de manera rutinaria en medio Luria-Bertani (LB). Cuando se requiera, el medio se suplementa con kanamicina (40 μ g/mL) ó ampicilina (100 μ /mL).

10.1.2 Parásitos: Se utilizó una cepa de *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin aislada de las lesiones de un paciente con leishmaniasis cutánea.

10.1.2.1. Cultivo de parásitos: Los promastigotes de *L. major* se cultivaron axénicamente 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 μ L de penicilina y 50 mg/mL de estreptomina). Cada 8 días se renovaron los cultivos dependiendo del crecimiento del parásito. Éstos fueron cultivados y mantenidos a 28°C hasta que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

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

10.2. Amplificación y clonación del gen MBA a partir de ADN genómico de *Leishmania major* en el plásmido pVAX1.

Todas las manipulaciones de ADN (PCR, restricciones, ligaciones, clonaciones y subclonaciones) se realizaron mediante técnicas convencionales de biología molecular.

10.2.1. Extracción de ADN de *Leishmania major*

Se partió de un cultivo de *L. major* 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 1X, 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 (10mM Tris-HCL pH 8.3; 50mM EDTA pH 8.8; SDS 1%), se le agregaron 50 µg/mL de RNAsa A y se incubó a 37°C por 4 h. Posteriormente se le agregaron 100 mg/mL de proteinasa K y se incubó a 42°C toda la noche. A la solución anterior se le 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 le agregaron volúmenes iguales de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI) a la fase acuosa, se mezcló por inversión suavemente y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. A la fase acuosa se le adicionó cloroformo/isopropanol, se mezcló suavemente y se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 10 min. A la fase acuosa de esta última extracción se le adicionaron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2,0 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló 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 ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a una D.O. de 260nm.

10.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR se amplificó el gen correspondiente al antígeno seleccionado a partir de ADN genómico de *Leishmania major*.

Se diseñaron primers específicos que amplifican la región codificadora del gen MBA de *Leishmania major* y fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de MBA

Primer	Secuencia (5'-3')s	Tamaño
KMBA F	AAGCTTTTCGCCACCATGGACAAGGTGGAGCTGGTGCAG	1336 (pb)
KMBA R	CACGAATTCTTACCCGCCGCTGGACATGGGCGAC	

La reacción de amplificación se preparó a partir de 1 μ l de ADN genómico de *L. major*. La mezcla de reacción consistió en 2.5 μ l de amortiguador 10X que contiene 1mM de MgCl₂ (Biolabs), 0.5 μ l de la mezcla de dGTP, dTTP, dATP y dCTP, 10 pmoles de ⁵⁴cada uno de los oligonucleótidos específicos y 0.5 μ l de Taq polimerasa (Biolabs). Las condiciones de amplificación en el equipo PCR Sprint IP20 (Thermo Scientific) fueron las siguientes:

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos MBA.

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	35
Alineamiento	65°C	30 seg	35
Elongación	72°C	1 min	35
Elongación final	72°C	7 min	1

Los productos de la reacción de PCR se analizaron en ³³geles de agarosa 1%, se visualizaron con bromuro de etidio (BIO-LAB) y fotografiaron en un transiluminador de luz UV. Se utilizaron como marcadores de PCR, fragmentos de 5000-500 pb Bio-ladder (Bio-Synthesis).

10.2.3. Clonación del gen *MBA* a partir de ADN genómico de *Leishmania major*.

Se realizó la purificación de los fragmentos de ADN amplificados, utilizando el kit QIAEX®II. Consistió en pesar el fragmento de agarosa con la banda deseada, agregar 3 veces el volumen de buffer Qx1, agregar aproximadamente 10 μ l de las perlas en suspensión QIAEX®, mezclar y dejar secar a 55°C por 10 min. Centrifugar ²⁷a 14 000 rpm, desechar el sobrenadante, lavar con 500 μ L de buffer Qx1, centrifugar a 14.000 rpm, desechar el sobrenadante, resuspender en buffer PE 500 μ l. Empastillar, dejar secar y resuspender en 20 μ l de agua estéril a ⁵²50°C durante 5 min, centrifugar a 14 000 rpm durante 14 min y agregar el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo.

Posteriormente se realizó la clonación del amplicón en el vector pCR84-TOPO (Invitrogen). Se mezcló 4 μL del producto de interés amplificado y purificado, 1 μL de solución salina y 1 μL del vector pCR84-TOPO. Se incubó a 22°C durante 30 min. Una vez realizada la reacción de ligación pCR84-TOPO:MBA, se realizó el protocolo de transformación en células *E. coli* DH5 α competentes con el plásmido. Para ello, a la reacción de la ligación pCR84-TOPO:MBA se le adicionó 100 μL de las células *E. coli* DH5 α competentes, se incubó en hielo durante 20 min y después de incubó por 2 min a 42°C o por 5 min a 37°C por 35 min. Los tubos se colocaron nuevamente en hielo por 2 min, se le 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 2.500 rpm, el sobrenadante resultante se desechó por decantación, las células se resuspendieron en aproximadamente 100 μL de medio sobrante. Las células serán espatuladas en placas LB/Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al observar crecimiento de colonias transformantes, se realizó una PCR colonia a partir de las colonias obtenidas. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

10.2.4. Purificación de ADN plasmídico

Posteriormente se realizó la purificación del ADN 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 25mM pH 8.0; EDTA 10mM pH 8.8 y sacarosa 50mM), posteriormente se le 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 por 15 minutos. Se le adicionaron 150 μL de acetato de potasio 3M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min, esta suspensión se centrifugó a 14.000 rpm por 3 min para separar el debris y el ADN cromosomal, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se le adicionó un volumen igual de una mezcla fenol-cloroforno (1:1), se mezcló con vortex 1 min y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el ADN se incubó con 20 μL de RNAsa A/T1a 37°C durante 1 hora. Se agregaron dos volúmenes de etanol al 95%, se incubó por 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14 000 rpm por 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 μ L de agua estéril. El ADN 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 pCR84-TOPO ya está linearizado con esta enzima.

Una vez obtenido este material se procedió a realizar un ensayo de restricción con las enzimas EcoRI/HindIII (pVAX) y BamHI/HindIII (pRSETA) para liberar el gen MBA clonado con el vector pCR84-TOPO. Para verificar la restricción enzimática, un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio se visualizó en el transiluminador de luz U.V. y la banda correspondiente al inserto se cortó; posteriormente se realizó la extracción en gel con el kit QIAEX® II, siguiendo las indicaciones mencionadas anteriormente.

10.2.5. Subclonación del gen MBA en el plásmido pVAX1

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

Una vez realizada la ligación de pVAX1::LmjMBA, se realizó el protocolo de transformación en células *E. coli* DH5a con el plásmido anteriormente mencionado. Las células fueron espatuladas en placas LB con kanamicina (40 μ g/mL), se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se observó crecimiento de colonias transformantes y se realizó PCR colonia a partir de las colonias obtenidas para seleccionar las clonas positivas. Se corrió un gel de agarosa al 1% para observar las reacciones que amplificaron el fragmento deseado, posteriormente se realizó la purificación del ADN plasmídico por el método de Maxiprep. Para esto, se inoculó una de las colonias positivas en 50 mL de medio LB/Kanamicina (40 μ g/mL) y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante.

Una vez obtenido este material se realizó un ensayo de restricción con las enzimas EcoRI y HindIII para liberar el gen MBA clonado en el vector pVAX1. Para verificar

la restricción enzimática se visualizó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en el transiluminador de luz U.V.

10.2.6. Reacción de secuenciación

Se utilizaron tubos de PCR estériles donde se colocaron 500-1000 ng de ADN plasmídico, 8 μ L de MIX y 10 pmoles de oligonucleótido T7 para una reacción y el oligonucleótido T3 para la otra, se llevó a 20 μ L con agua estéril. Se sometió al programa 96°C por 30 seg, seguido de 30 ciclos de 96°C por 20 seg, 53°C por 20 seg y 60°C por 4 min. Posteriormente las columnas se hidratan para la purificación, se colocaron las muestras y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min, en ellas se adiciono 20 μ L de la reacción de PCR, las columnas se centrifugaron a 3000 rpm por 2 min, se colectaron y se dejó secar la muestra en "speed vac". Se almacenaron a -20°C y se secuenció 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 377-18Ein DNA Sequencer, del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-México a cargo de la QFB. María Guadalupe Aguilar González.

10.3. Clonación y purificación de la proteína recombinante

Se diseñaron primers específicos (FMBA y RMBA) que amplifican la región codificadora del gen MBA sintetizados por Sigma-Aldrich. Mediante la técnica PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes al antígeno MBA a partir de ADN genómico de *Leishmania major*.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de MBA para la proteína recombinante.

Primer	Secuencia (5'-3')s	Tamaño
PMBA F	CGGATCCTACAAGGTGGAGCTGGTGCAGGTG	1336 (pb)
PMBA R	GAAATATAAGCTTACCCGCGCTGGACATGGGCGAC	

Posteriormente el fragmento PMBA obtenido por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind* III fue subclonado en el vector pRSETA tratado con las mismas enzimas,

mediante el kit de ligación rápida, en la que se usó la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas), la cual lleva a cabo la ligación entre el inserto y el vector; obteniendo así la construcción del plásmido recombinante pRSETA::MBA. 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 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 horas 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 a una concentración final de 1 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactósido (IPTG) incubándose durante 2 horas a 37°C en agitación constante. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4.000 rpm por 20 min, llevándose a cabo lavados con 20 mL PBS 1X. Las células se resuspendieron en 20 mL de Tris-HCL 30 mM, sacarosa 20%, EDTA 1 mM pH 8.0 y se incubó 10 min a temperatura ambiente 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 20mM, 0.5% de NP-40, pH 7.4, junto con ellos se adicionaron inhibidores, TLCK 5mM, IAA 3 mM, NEM 5 mM, leupeptina 1 mM y PMSF 1 mM, 1 mg/mL de lisozima y la muestra se incubó 1 min en hielo. Las muestras se sonicaron 3 veces por 1 min 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 µm, posteriormente se pasó a una columna de Ni-agarosa (Novagen 69670-3) previamente equilibrada con Buffer A (Tris-HCL 20 mM pH 8.5; KCL 1 M; Imidazol 20 mM; glicerol al 10%; βMe 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%; βMe 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 analizaron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras visualizadas por tinción con Azul de Coomassie.

10.4. 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 (SDS-PAGE) se tificaron con azul brillante de Coomassie R-250. Después de la tinción, los geles se incubaron en solución destefidora (ácido acético glacial al 20% y metanol al 80%) hasta que las bandas se visualizaron con claridad.

Para las inmunotransferencia 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 al 2% (Tris 10 mM; 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 por 15 min) y se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a temperatura ambiente. Enseguida se lavó con TBST 3 veces y se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina: BICP y NBT. La membrana se incubó hasta que las bandas fueron visibles (10-30 min). Finalmente, la membrana se lavó con agua para obtener la reacción de la enzima

10.5. Determinación de anticuerpos por ELISA

Los anticuerpos anti-MBA fueron detectados por ELISA usando placas cubiertas con 5 µg/mL de la proteína recombinante MBA de *L. major* o *L. mexicana* y con 5 µg/mL de extractos de promastigotes en cultivo de *L. major* o *L. mexicana*. Cada pozo se incubó toda la noche a 4 °C, con 50 µL del antígeno disuelto en NaHCO₃ 0.11 M pH 9.6. El antígeno no unido fue removido por lavados con PBS-Tween 0.05% un total de 3 veces. Enseguida se añadieron los sueros de los ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmMBA y los sueros controles a una dilución 1:100 por 2 h a 37 °C. Después de 3 lavados con PBS-Tween 0.05% y un último lavado con PBS, los pozos se incubaron con un segundo anticuerpo peroxidado

53 anti-ratón IgG por 1 h a 37 °C. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se les agregó el sustrato: 2,2 azino bis (3-ethylbenothiazoline 6 sulfuric acid). Se mantuvieron en oscuridad y las lecturas se efectuaron 10 min después a 405 nm.

10.6. Esquema de inmunización

10.6.1. Inmunización con ADN

Ratones hembras BLAB/c (4-6 semanas de edad) fueron divididos en 3 grupos. Se sangraron para obtener suero pre inmune y posteriormente se inmunizaron con PBS, con el vector pVAX1 o con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Los ratones se inmunizaron 3 veces por vía intramuscular (una inmunización cada 15 días), con una concentración de 100 µg del ADN plasmídico diluido en 50 µL de PBS como vehículo. Al término del esquema de inmunización los animales se sangraron para la obtención de los sueros inmunes.

10.7. Efecto profiláctico de la vacuna de ADN en ratones infectados con *L. major*.

Ratones hembras BALB/c (4-6 semanas de edad) fueron divididos en 3 grupos. Se sangraron para obtener suero pre inmune y posteriormente se inmunizaron con PBS, con el vector pVAX1 o con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Los ratones se inmunizaron 3 veces por vía intramuscular (una inmunización cada 15 días), con una concentración de 100 µg del ADN plasmídico. Treinta días después de la última inmunización, los ratones se retaron en el cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *L. major* en la fase estacionaria resuspendidos en PBS estéril. Se realizó el seguimiento de la evolución de la lesión cada 8 días durante 60 días, haciendo medición de la lesión en el cojinete plantar utilizando un calibrador Vernier.

10.8. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN en ratones infectados con *L. major*

Ratones hembras BALB/c (4-6 semanas de edad) se dividieron en 3 grupos. Se sangraron para obtener el suero pre inmune y posteriormente se infectaron en el cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *L. major* cosechado en la fase

estacionaria de crecimiento y se resuspendieron en PBS estéril. Se realizó el seguimiento de la evolución de la lesión cada 8 días, haciendo medición de la lesión en el cojinete plantar utilizando un calibrador Vernier. Treinta y cinco días después de la infección los ratones se trataron de la siguiente manera: grupo 1, con PBS; grupo 2, con el ADN plasmídico del vector pVAX1; grupo 3, con el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA.

11. RESULTADOS

11.1 Selección del gen MBA por análisis bioinformático

En nuestro laboratorio, mediante un análisis bioinformático del genoma de *L. mexicana*, se seleccionaron tres proteínas que poseían hélices transmembranales con el programa TMHMM2.0, este servidor en línea predice con un 97-98% de efectividad, la localización y orientación de alfa hélices transmembranales en secuencias de proteínas. Este sistema hace clasificación empleando los siguientes criterios: la composición de los aminoácidos, la composición de dipéptido y la composición de la secuencia basada en las propiedades fisicoquímicas de aminoácidos. De esta manera se seleccionaron las proteínas membranales ubicadas en membrana plasmática de las cuales se escogieron, por una parte, proteínas expresadas en forma única en cada estadio del parásito y por otra, proteínas con una expresión compartida en los dos estadios. La proteína finalmente seleccionada, corresponde a una fosfatasa ácida de membrana plasmática de los promastigotes la cual por microscopía confocal también se localizó en los amastigotes de *L. mexicana* (Burgos-Reyes, 2016).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de los aminoácidos de la proteína codificada por el gen MBA entre las especies de *L. major* y *L. mexicana*. La similitud entre ambas secuencias fue del 87% sin cambios de aminoácidos en el sitio catalítico en ambas proteínas (Fig. 1).


```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

XP_003874608.1  RLRSISFLYRCVWVWVWVWVSAWVSAFPHYKVELVQVWHRHARSPLVDDRHTLICGT
XP_001686834.1  --HRRDIAPLYPCAVWVWVWVSAWVLAFPHYKVELVQVWHRHARSPLVDDRHTLICGT
          *| |      ,*****
          *| |      ,*****

XP_003874608.1  EFPCDFLNYEQQAPLVNLGKYLHRYTENPSVVSQPYFPYSIYMLSESYTRSTDVLRITLQ
XP_001686834.1  EFPCDFLNYEQQAPLVNLGEYLRHRYTEDRSVVSSTPYFPYSIYMLSESYTRSTDVLRITLQ
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  SANGLLQQLFPHNSTFFPAZHAVGRKEDVLLHSYMHPIHARAFNYAKEELBAYCDEVLDK
XP_001686834.1  SANGLLRQLFPHNSQFFPAZHVTYGGDGDVLLHSYMHPIHARAFNYAKQERRAACDQVLDK
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  LHSFDQLQAVAAEYVHSQDFCANYTLRSRCAKRLCDGGRAYEPTGRLESPLLSRHLDOVC
XP_001686834.1  LHSFDQLQAVAAEYVHSQDFCANYTLRSRCAERLCDGGRAYESTGRLESPLLSRHLDOVC
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  AVTANSSYFYPAYNASPHVHQDQAPFYHLAKLLVSMHVAHQQRETAPPYKLYEYSAHOT
XP_001686834.1  AVTANSHFCFAYNASPHVHQDQAPFYHLAKLLVSMHVAHQQRETAPPYKLYEYSAHOT
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  TISPLAVSFDNSMEAPLPPFGTAFIIEILLSLTDAPAAPSSFYVRLLRQHSQVRPESHPF
XP_001686834.1  TISPLAVSFDNSMEAPLPPFGTAFIIEILLSLTDAPAASSRFYVRLLRQHSQVRPESHPF
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  FALSHFDRRCQDQATGNTYIATDNIICPFADPERFIDNSTAPTSPIHGTCYLDPQLLRHDCPI
XP_001686834.1  FALSHFDRRCQDQATGNTYIATDNIICPFDFPERFIDNSTAPTSPIHGTCYLDPQLLRHDCPI
*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  DVNSDRSLSEDCLFYRQHCNYSCTGTEYLLDAIDVQCHRIPAMISTAGSSPHSSGGIAV
XP_001686834.1  DTSQDRSLSEDCLFYRQHCNYSCTGTEYLLDAIDVQCHRIPAMISTVSSPHSSGGIAA
*_*|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

XP_003874608.1  LSITLFTVGGVAVSVDGHEWRRYKFKKQQAIEV
XP_001686834.1  LSEVLFIIIDGVASIDGHEWRRYKFKKQQAIEV
***|***|*****|*****|**|**|**|**

```

Figura 1. Alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW. La secuencia XP_003874608.1 corresponde a *L. mexicana* cuyo tamaño es de 516 aminoácidos y la secuencia XP_001686834.1 corresponde a *L. major* cuya secuencia es de 514 aminoácidos. Recuadro en rojo indica el sitio catalítico correspondiente a una fosfatasa dependiente de histidinas.

Se realizó un modelamiento de la estructura terciaria de la proteína que codifica para MBA entre ambas especies en el programa PyMol y la similitud fue del 94% (Fig. 2)



A. Fosfatasa acida de *L. major* B. Fosfatasa acida de *L. mexicana* C. Empalme

Figura 2. Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína MBA. Se usaron las secuencias (A) XP_001686834.1 de *L. major* y la secuencia (B) XP_003874608.1 de *L. mexicana* para el modelamiento de las estructuras terciarias de las proteínas. (C) corresponde al empalme de las estructuras obtenidas.

Con el fin de conocer los epitopos que comparten ambas especies, a partir de la región extramembranal de la proteína MBA de *L. mexicana* y *L. major*, se realizó la predicción de estos para los linfocitos B y linfocitos T citotóxicos empelando los servidores CBTOPE y NetCTL 1.2 respectivamente.

Los resultados de este análisis indican que ambas proteínas comparten algunos epitopos, y en otros se observan algunas diferencias (amarillo), a pesar de tener diferencias en las secuencias de aminoácidos (Tabla 4).

Tabla 4. Predicción de epitopos para linfocitos T y linfocitos B de las especies de *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*.

EPITOPOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS		EPITOPOS LINFOCITOS B	
<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>
18-27...LVSDNLSU	18-28...LVSDNLSU	21-28...HNSGASDZ	21-28...HNSGASDZ
45-51...AMKLNLSDF	46-52...AMKLNLSDF	76-82...GTYLKHYTEKRV	71-84...GATLKHYTEKRV
62-70...VYDTPYTF	63-71...VYDTPYTF	26-33...SEPTDZ	26-31...SEPTDZ
82-90...STVLRSLG	82-91...STVLRSLG	109-124...STVLRSLGSLGAS	109-113...STVLRSLGSLGAS
109-111...NSDFFAH	117-121...KSNVLRV	162-177...KARFVFAKSNVAK	172-135...KARFVFAKSLAV
152-175...KQDFCANF	156-174...KSCDFCANF	209-216...KPTLRKCKR	194-176...KPTLRKCKR
189-195...KLDGSRAT	189-191...KLDGSRAT	221-231...GRAPYFSL	179-189...GRAPYFSL
213-219...KMSDFCAF	213-219...KAYTAMSEF	232-234...LNRSLDY	232-236...LNRSLDZ
232-240...ITAPYKLF	233-233...KTAHAKVVF	262-271...SNPYKQSGAT	238-228...SNPYKQSGAT
292-300...GTAFNELL	224-226...KMSDFYKAF	320-324...KAKOGRKAPPYKLETSANST	340-352...YAKOGRKAPPYKLETSANST
348-348...KQATFANF	226-224...ITAPYKLF	328-327...KSGAKTESAT	312-312...KSGAKTESAT
369-377...KTFPMKCE	342-341...KQATFANF	379-384...KQATQNF	323-380...QDQATQNF
377-385...KLPQLLR	376-378...KTFPMKLF	392-394...KPTQYER	389-395...KPTQYER
398-406...KLSLDGLT	376-384...KLPQLLR	427-434...STVLRSLGSLG	426-432...STVLRSLGSLG
412-420...KYSKQDHF	398-407...KLSLDGLT	462-467...KTKHCLAV	439-467...KTKHCLAV
	412-420...KYSKQDHF	462-474...KHPANVLS	462-471...KHPANVLS
		503-520...KRVVWQYKNTKQDQV	502-520...KRVVWQYKNTKQDQV

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

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

La amplificación y clonación de gen *LmxMBA* en el vector pCR4-TOPO y la posterior sublocación en el plásmido para vacunas de ADN pVAX1 ya se había realizado en nuestro laboratorio. Por lo tanto, a partir de la construcción del plásmido pVAX1::*LmxMBA* se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. Posteriormente se hizo la restricción con las enzimas HindIII/EcoRI para comprobar que sí se tenía subclonado el gen de interés (Fig. 3 B)

De igual forma, se realizó la amplificación y clonación del gen *LmjMBA* para su posterior uso. Para obtener el fragmento de ADN (1336 pb) que codifica para la región extramembranal de la proteína, se habían diseñado oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *LmxMBA* incluyendo secuencias de reconocimiento para restricción enzimática, para HindIII hacia el extremo 5' y EcoRI en el extremo 3'. La secuencia correspondiente a *LmjMBA* se obtuvo mediante la 4 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN genómico de *L. major* (Fig. 3 A). El producto amplificado fue clonado en el vector pCR4::TOPO generando el plásmido pTOPO:*LmjMBA*. Se obtuvieron colonias transformantes con las cuales se realizó PCR colonia para verificar cuales tenían el inserto. Se seleccionó una de las colonias positivas para realizar la purificación de ADN plasmídico y hacer la restricción enzimática para comprobar que se tenía clonado el gen de interés (Fig. 4 B).

El inserto *LmjMBA*, liberado de la construcción pTOPO:*LmjMBA* se subclonó en el vector de expresión pVAX1. De igual forma, las colonias transformantes se analizaron mediante PCR colonia para verificar cuales tenían el inserto (Fig. 5 A). De este ensayo, se obtuvieron 5 colonias positivas, a una de éstas se le realizó la extracción y purificación de ADN plasmídico y posteriormente se hizo la restricción con las enzimas HindIII/EcoRI para comprobar que sí se tenía subclonado el gen de interés. El tamaño de los productos esperados era de 3000 pb y 1336 pb

aproximadamente (Fig. 5 B) y se realizó la secuenciación de la construcción pVAX1::LmjMBA para corroborar la correcta orientación dentro del vector (datos no mostrados).

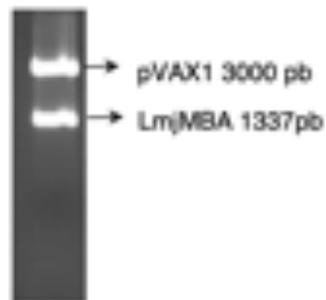


Figura 3. Purificación del ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA. Liberación del inserto clonado con HindIII/EcoRI.

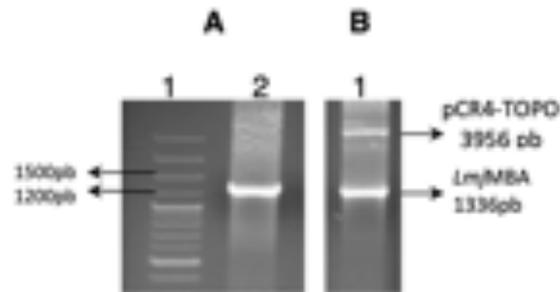


Figura 4. Amplificación y clonación del gen *LmMBA* en el vector pCR4-TOPO. (A) El gen *LmMBA* fue amplificados a partir de ADN genómico de *L. major*. (1) MPM, (2) producto de PCR (1336 pb). (B) Restricción enzimática de la construcción TOPO::*LmMBA*. (1) Liberación del inserto con las enzimas HindIII/EcoRI

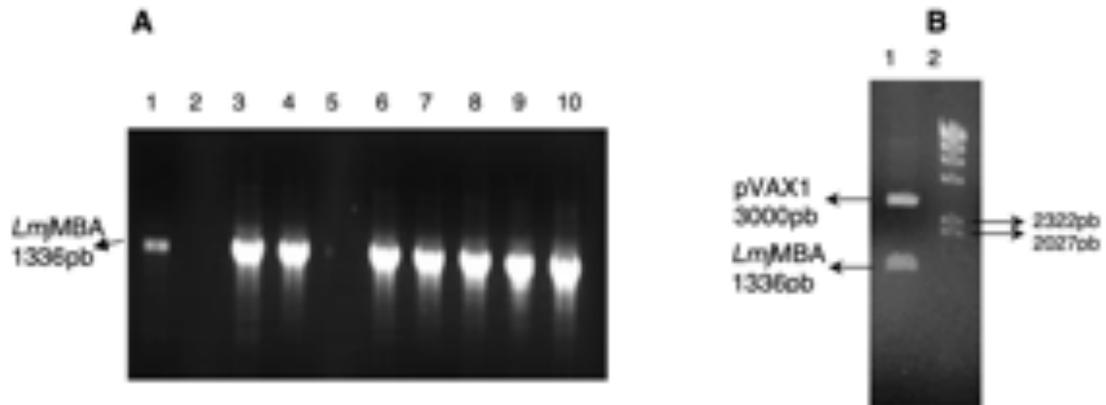


Figura 5. Subclonación del fragmento *LmMBA* en el vector pVAX1. (A) PCR colonia a partir de las colonias transformantes con el plásmido pVAX1::*LmMBA* 1) control positivo *LmMBA* amplificado a partir de ADN genómico carriles 2-10) productos de PCR a partir de colonias transformantes. (B) Purificación del ADN plasmídico pVAX1::*LmMBA*. 1) Liberación del inserto con las enzimas HindIII/EcoRI, 2) MPM.

11.3. Evaluación de la evolución de la lesión ocasionada *L. major* en el cojinete plantar de ratones

Inicialmente se evaluó la evolución de la lesión en el cojinete plantar de los ratones debido a que en nuestro laboratorio no se tenía estandarizada una dosis de infección en tiempo y forma de la lesión causada por esta especie. Por lo tanto, se infectaron ratones con dosis bajas de promastigotes en cultivo de *L. major* (5×10^4 y 1×10^5) y dosis altas (5×10^5 ; 1×10^6 ; 2×10^6 y 5×10^6). Se midió el crecimiento de la lesión durante 50 días para conocer la infección por esta especie en tiempo y forma con cada una de las dosis empleadas.

A los 23 días después de la infección con diferentes dosis, los ratones que fueron infectados con dosis altas (5×10^6 y 2×10^6) mostraron una inflamación en el cojinete plantar más progresiva en comparación con ratones infectados con dosis bajas (5×10^4 y 1×10^5). Con la dosis infectiva de 1×10^6 de promastigotes de *L. major* al día 23 el cojinete plantar de los ratones mostró una inflamación de curso progresiva pero menos ulcerativa, por lo que para los siguientes se utilizó esta dosis de infección y/o desafío.

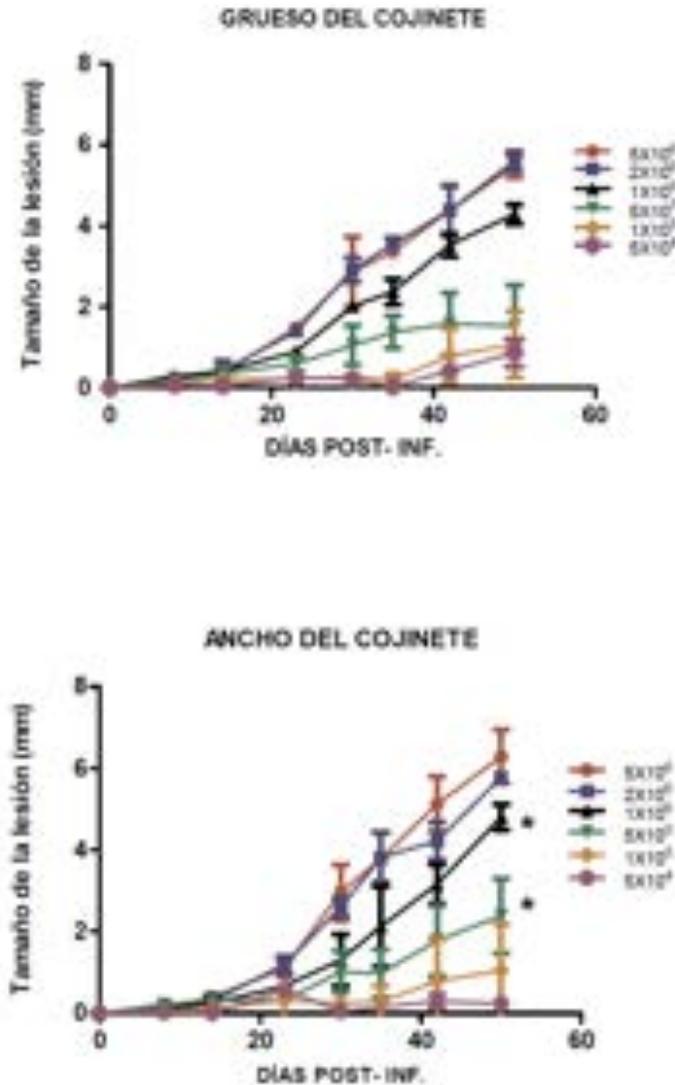


Figura 6. Crecimiento del cojinete plantar en ratones infectados por *L. major*. Se hizo un análisis estadístico con la prueba de Friedman (para K muestras dependientes). Significancia estadística si $p < 0.05$. Se encontraron diferencias significativas entre las dosis de 5×10^5 y 1×10^6 siendo el valor de $p=0.007$ y $p=0.0001$ respectivamente. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes $n=4$.

11.4. Efecto profiláctico de la vacuna de ADN que codifica para el gen *MBA* de *Leishmania mexicana* contra la infección por *Leishmania major*.

Para evaluar el efecto profiláctico de la vacunación con ADN, se usaron 4 por grupo ratones BALB/c se inmunizaron un total de 3 veces con el ADN plasmídico pVAX1::*LmxMBA*. Como control se vacunaron ratones con el vector pVAX1 y ratones solo con PBS. Las vías de administración y dosis fueron descritas en materiales y métodos. Pasados 30 días después de la última inmunización, los ratones fueron infectados en el cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *L. major*. El proceso de infección se evaluó mediante la medición del tamaño del cojinete plantar (mm) por 60 días y la evolución de la lesión con y sin vacunación (grupo inmunizado con PBS).

En las figuras 7B y 7C, se puede observar una tendencia para los diferentes grupos de ratones. En el caso del grupo de ratones inmunizados con PBS se presentó un aumento progresivo y ulcerativo del cojinete plantar desde el día 20 hasta el último día de la medición (60 días post-infección). En el grupo vacunado con pVAX1 y con el plásmido de ADN pVAX1::*LmxMBA* el crecimiento de la lesión fue igual que el grupo de animales control, observándose una lesión de mayor tamaño tanto en el ancho como en el grueso del cojinete plantar en los ratones que fueron inmunizados con pVAX1::*LmxMBA*. En la figura 7A, se muestra el desarrollo macroscópico de la lesión después de 20, 40 y 60 días de infección.

Estos resultados indican que la inmunización previa con el ADN plasmídico pVAX1::*LmxMBA* no impidió el desarrollo de una lesión cutánea después de un reto con promastigotes de *L. major* en el cojinete plantar de los ratones.

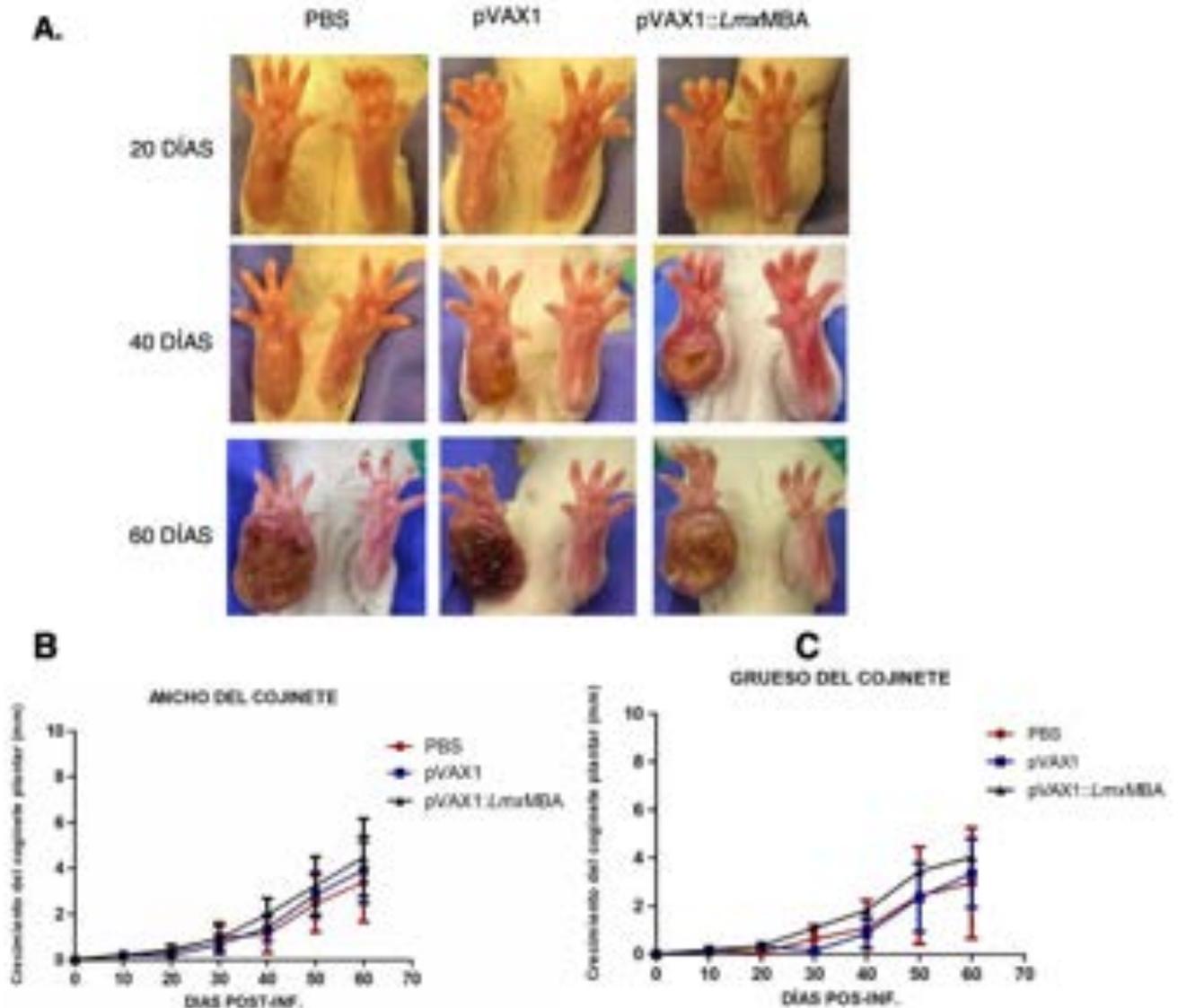


Figura 7. Efecto profiláctico de la vacunación con el ADN que codifica para el gen *LmxMBA* contra la infección por *Leishmania major*. A. Desarrollo macroscópico de la lesión después de la infección con 1×10^6 promastigotes de *L. major* (30, 40 y 60 días) en ratones previamente vacunados con ADN. **B y C.** Seguimiento del tamaño de la lesión. Se midió el grueso y el ancho por 60 días del cojinete de la pata infectada (derecha) y como control, se realizó la medición del cojinete plantar no infectado (izquierdo) durante este mismo periodo. Las fotos y las gráficas son representativas de dos experimentos independientes con al menos 3 animales por grupo.

11.5. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN que codifica para el gen *MBA* de *Leishmania mexicana* en ratones infectados con *Leishmania major*.

Para evaluar el efecto terapéutico de la vacunación con ADN, ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *L. major* y 35 días después de la infección los ratones fueron vacunados con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Como control se vacunaron ratones con el vector pVAX1 y ratones vacunados solo con PBS. Las vías de administración y dosis fueron descritas en materiales y métodos. El proceso de infección se evaluó mediante la medición del tamaño del cojinete plantar (mm) y la evolución de la lesión con y sin vacunación (grupo inmunizado con PBS).

Los grupos de ratones inmunizados con PBS y con el plásmido vacío pVAX1 desarrollaron un crecimiento progresivo y ulcerativo de la lesión en el cojinete plantar tanto en el ancho como en el grueso desde los 23 días post-infección hasta el último día de medición (70 días post-infección). En cuanto al grupo de animales infectados que posteriormente fueron vacunados con el ADN (35 días post-infección), mantuvieron el desarrollo de la lesión en tiempo y forma similar al grupo control, es decir, la vacunación con el ADN plasmídico de pVAX1::LmxMBA no pudo revertir los signos y síntomas clínicos de la LCL en los ratones infectados con promastigotes *L. major*.

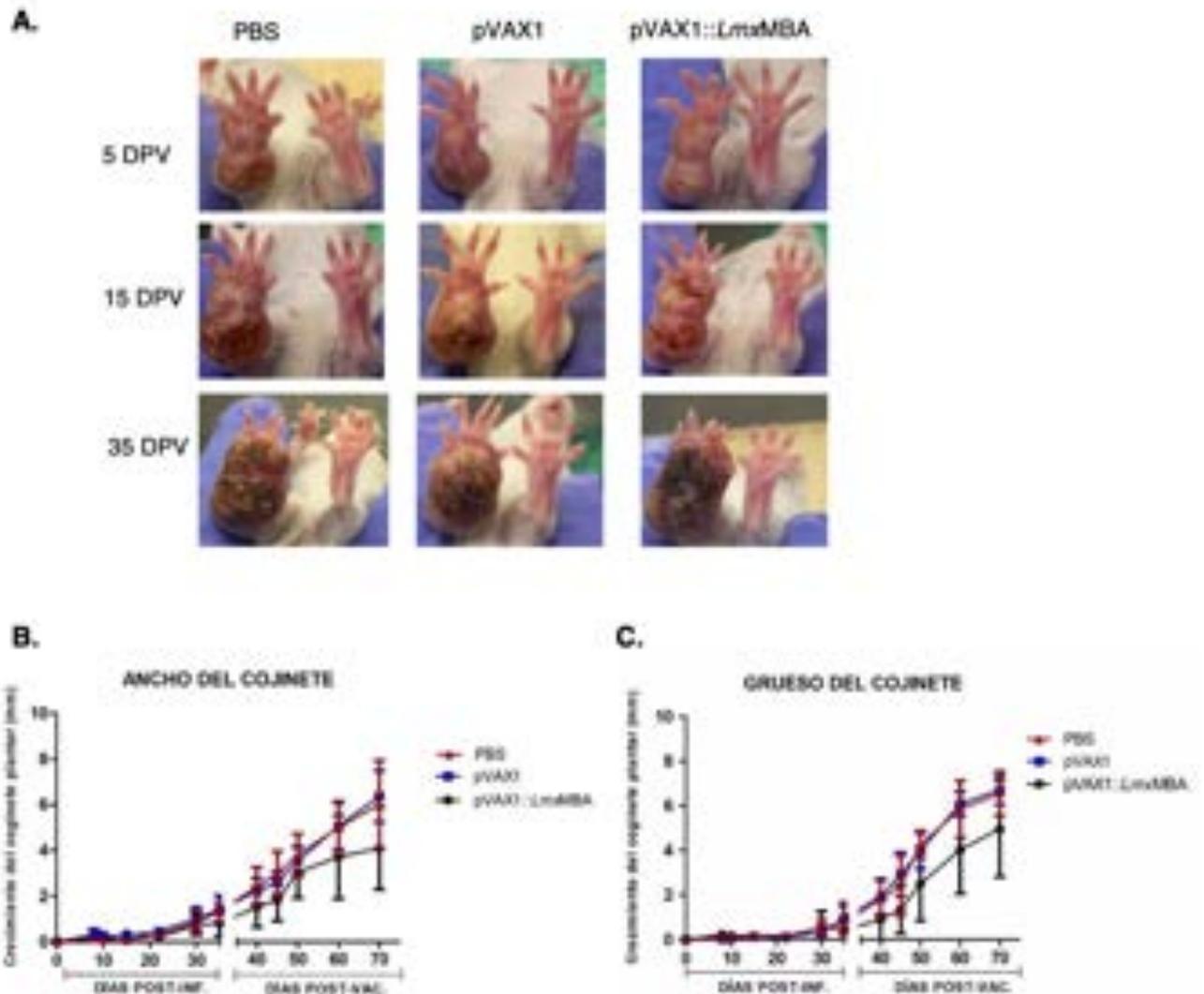


Figura 8. Efecto terapéutico de la vacuna de ADN que codifica para el gen *LmxMBA* contra la infección de *Leishmania major*. A. Evolución macroscópica de la lesión en ratones infectados previamente con 1×10^6 promastigotes de *L. major* e inmunizados 35 días post-infección con el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA. B y C, seguimiento del tamaño de la lesión 5, 15 y 35 días post-vacunación. Se midió el grueso y el ancho por 35 días del cojinete de la pata infectada (derecha) y como control, se realizó la medición del cojinete plantar no infectado (izquierdo) durante este mismo periodo. Las fotos y las gráficas son representativas de 4 animales por grupo.

11.6. Expresión y purificación de la proteína recombinante.

11.6.1. Purificación de la proteína recombinante MBA de *L. mexicana*

Se purificó la proteína recombinante MBA tanto de *L. major* como de *L. mexicana*. Para purificar la proteína recombinante MBA de *L. mexicana*, se partió del plásmido pRSETA::LmxMBA que previamente se había diseñado y construido en el laboratorio. Con este se transformaron bacterias BL21 (DE3) pLysS 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 10%. En la figura 9, se muestra un gel PAGE-SDS AL 10%, en donde se corrieron 8 eluidos de la purificación de la proteína recombinante rLmxMBA en donde se observa una banda del peso molecular esperado (49 kDa).

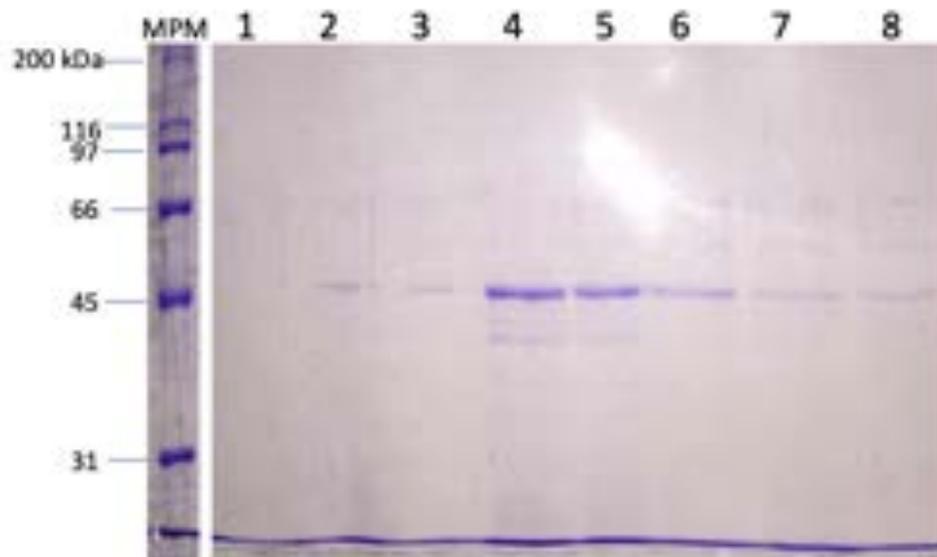


Figura 9. Purificación de la proteína recombinante rLmxMBA. Bacterias BL21 (DE3) pLysS se transformaron con el plásmido pRSETA::LmxMBA y se indujo la expresión de la proteína con 1mM de IPTG. Se muestra en MPM y en los carriles del 1-8 alícuotas de los eluidos de la purificación por afinidad que fueron corridos en PAGE-SDS al 10% y tefidos con azul brillante de Coomasie

11.6.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante MBA de *L. major*

Para purificar la proteína recombinante MBA de *L. major*, se realizó la amplificación del fragmento de ADN (1336 pb) que codifica para la región extramembranal de la proteína, se habían diseñado oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *rLmjMBA* incluyendo secuencias de reconocimiento para restricción enzimática, para BamHI hacia el extremo 5' y HindIII en el extremo 3'. La secuencia correspondiente a *rLmjMBA* se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN genómico de *L. major*. El producto amplificado fue clonado en el vector pCR4::TOPO generando el plásmido pTOPO::*rLmjMBA*. Se obtuvieron colonias transformantes con las cuales se realizó PCR colonia para verificar cuales tenían el inserto. Se seleccionó una de las colonias positivas para realizar la purificación de ADN plasmídico y hacer la restricción enzimática para comprobar que se tenía clonado el gen de interés. El inserto *LmjMBA*, liberado de la construcción pTOPO::*rLmjMBA* se subclonó en el vector de expresión pRSETA. De igual forma, las colonias transformantes se analizaron mediante PCR colonia para verificar cuales tenían el inserto (Fig., 10A). De este ensayo, se obtuvieron 5 colonias positivas, a una de éstas se le realizó la extracción y purificación de ADN plasmídico y posteriormente se hizo la restricción con las enzimas BamHI/HindIII para comprobar que sí se tenía subclonado el gen de interés. El tamaño de los productos esperados era de 2897 pb y 1336 pb aproximadamente (Fig. 10B).

Con esta construcción (pRSETA::*rLmjMBA*) se transformaron bacterias BL21 (DE3) pLysS y se hizo la purificación de la proteína por columna de afinidad siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. En la figura 11, se muestra un gel PAGE-SDS AL 10% de las muestras en donde se realizó la inducción para la expresión de la proteína recombinante a partir de diferentes colonias *rLmjMBA* en donde se observa una banda del peso esperado (49 kDa). De igual forma en la figura 12, se muestra un PAGE-SDS AL 10%, en donde se corrieron 8 eluidos de la purificación de la proteína recombinante *rLmjMBA*.

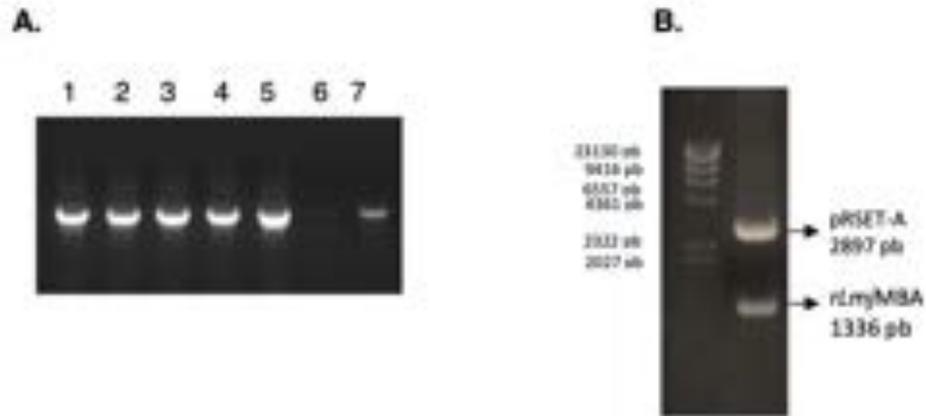


Figura 10. Subclonación del fragmento *rLmMBA* en el vector pRSETA. (A) PCR colonia a partir de las colonias transformantes con el plásmido pRSETA::*rLmMBA* carril 7) control positivo *rLmMBA* amplificado a partir de ADN genómico carriles 1-5) productos de PCR a partir de colonias transformantes. **(B)** Purificación del ADN plasmídico pRSETA::*rLmMBA*, Carril 1) MPM, carril 2) liberación del inserto con las enzimas BamHI/HindIII.

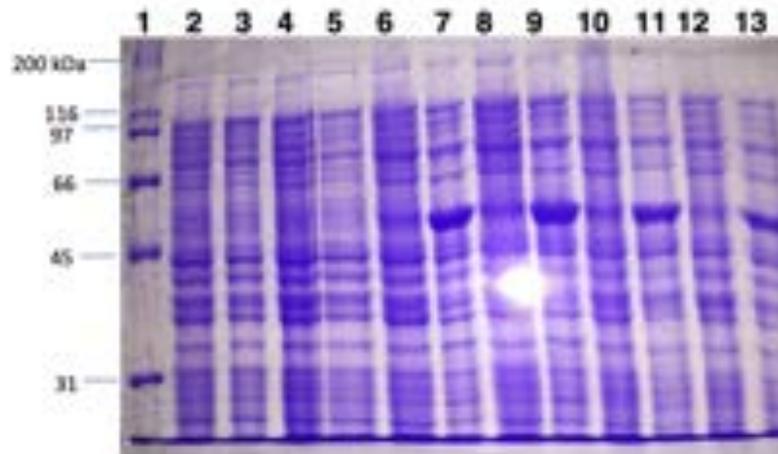


Figura 11. Expresión de la proteína recombinante MBA de *L. major*. Bacterias BL21 (DE3) pLysS se transformaron con el plásmido pRSETA::*LmMBA* y se indujo la expresión de la proteína con 1 mM de IPTG. Se muestran los MPM y en los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12, extractos bacterianos sin inducir y en los carriles 1, 3, 5,

7, 9, 11 y 13, extractos bacterianos inducidos corridos en PAGE-SDS al 10% y teñidos con azul brillante de Coomassie.



Figura 12. Purificación de la proteína recombinante rLmjMBA. Bacterias BL21 (DE3) pLysS se transformaron con el plásmido pRSETA::rLmjMBA y se indujo la expresión de la proteína con 1 mM de IPTG. Carril 1) bacterias no inducidas, carril 2) bacterias inducidas y en los carriles 3-8) alícuotas de los eluidos de la purificación que fueron corridos en PAGE-SDS al 10% y teñidos con azul brillante de Coomassie.

11.7. Determinación de anticuerpos obtenidos por inmunización con el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA.

La determinación de anticuerpos anti-LmxMBA producidos por ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA fue llevada a cabo mediante inmunotransferencia. Los sueros de los ratones inmunizados se incubaron (1:100) con extractos de promastigotes de *L. major* transferidos a membranas de nitrocelulosa. Como se puede ver en la figura 15, hubo un mayor reconocimiento en el patrón de proteínas con los anticuerpos generados por la vacunación terapéutica (Fig. 13B) que con los anticuerpos generados por la vacunación profiláctica (Fig. 13A). Por lo cual, se decidió realizar ensayos de ELISA con la proteína recombinante MBA de *L. mexicana* y *L. major* y usando extractos de promastigotes en cultivo de *L. mexicana* y *L. major* para analizar el nivel de anticuerpos generados por los dos tipos de vacunación.

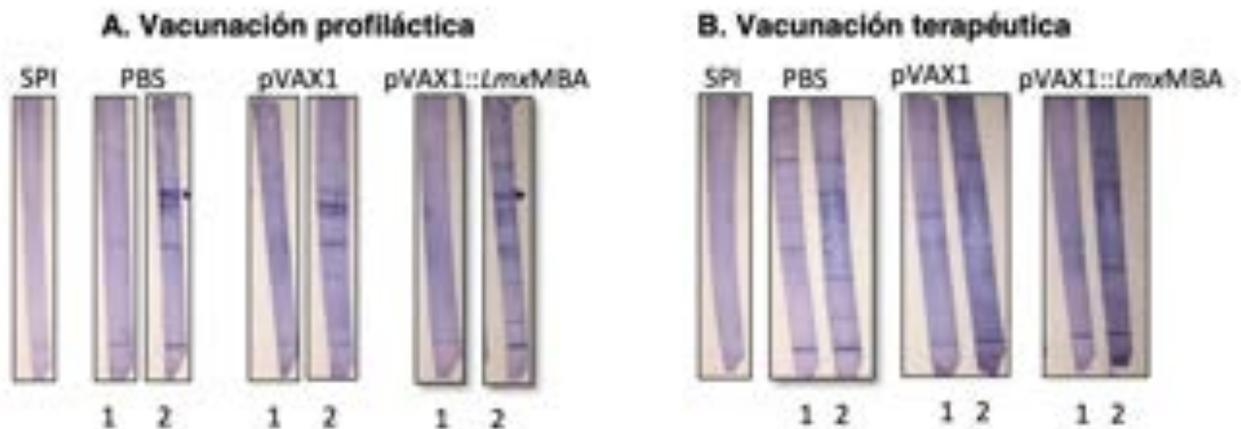


Figura 13. Determinación de anticuerpos anti-LmxMBA en ratones inmunizados. (A) Ratones BALB/c fueron inmunizados vía i.m. en tres ocasiones con 100 μ g del plásmido pVAX1::LmxMBA y 30 días después de la última inmunización se infectaron con promastigotes de *L. major*. Línea 1, corresponde a un pool de sueros de ratones inmunizados y línea 2, corresponde a pool de sueros de ratones inmunizados e infectados, colectados 60 días después de infección. **(B)** Ratones BALB/c se infectaron con promastigotes de *L. major* y después de 35 días se inmunizaron 3 veces con 100 μ g del plásmido pVAX1::LmxMBA. Línea 1,

corresponde a un pool de sueros de ratones infectados y línea 2, corresponde a un pool de suero de ratones infectados y posteriormente inmunizados.

Para la determinación de anticuerpos anti-LmxMBA por ELISA, se cubrieron las placas con 5 µg/mL de los extractos de promastigotes (*L. major* o *L. mexicana*) o con 5 µg/mL de la proteína recombinante MBA (*L. major* o *L. mexicana*). Los sueros de los ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA tanto de la vacunación terapéutica como de la profiláctica se incubaron a una dilución de 1:100. Los pozos fueron incubados con un anticuerpo peroxidado anti-ratón IgG, luego se agregó el sustrato: 2,2 azino bis (ethylbenzothiazoline 6 sulfuric acid) y después de 10 minutos de incubación las lecturas se efectuaron a 405 nm.

Usando extractos de promastigotes de *L. mexicana* o de *L. major* en los ensayos de ELISA, no hubo diferencias en los títulos de los anticuerpos producidos durante la vacunación profiláctica usando el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA después del reto con promastigotes de *L. major* (Fig. 14A y 14B). En contraste, en la vacunación terapéutica además de aumentar la producción de anticuerpos, usando extractos de promastigotes de *L. mexicana* o de *L. major* en los ensayos de ELISA si se obtuvo un nivel mayor en los animales que fueron infectados y luego inmunizados con el ADN plasmídico (Fig. 15A y 15B), sin embargo, en ambos grupos de vacunación, la producción de anticuerpos no fue más elevada que la de los animales controles.

Empleando la proteína recombinante MBA de *L. mexicana* o de *L. major* en los ensayos de ELISA, la producción de anticuerpos específicos contra la proteína MBA resultó menor en la vacunación profiláctica usando el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA después del reto con promastigotes de *L. major* (Fig. 16 A y 16B). En contraste, en la vacunación terapéutica además de aumentar la producción de anticuerpos específicos anti-MBA, éstos tuvieron más especificidad usando la proteína recombinante de *L. mexicana* que la recombinante MBA de *L. major*. Se obtuvieron títulos mayores en los animales que fueron infectados y luego inmunizados con el ADN plasmídico (Fig. 17A yB).

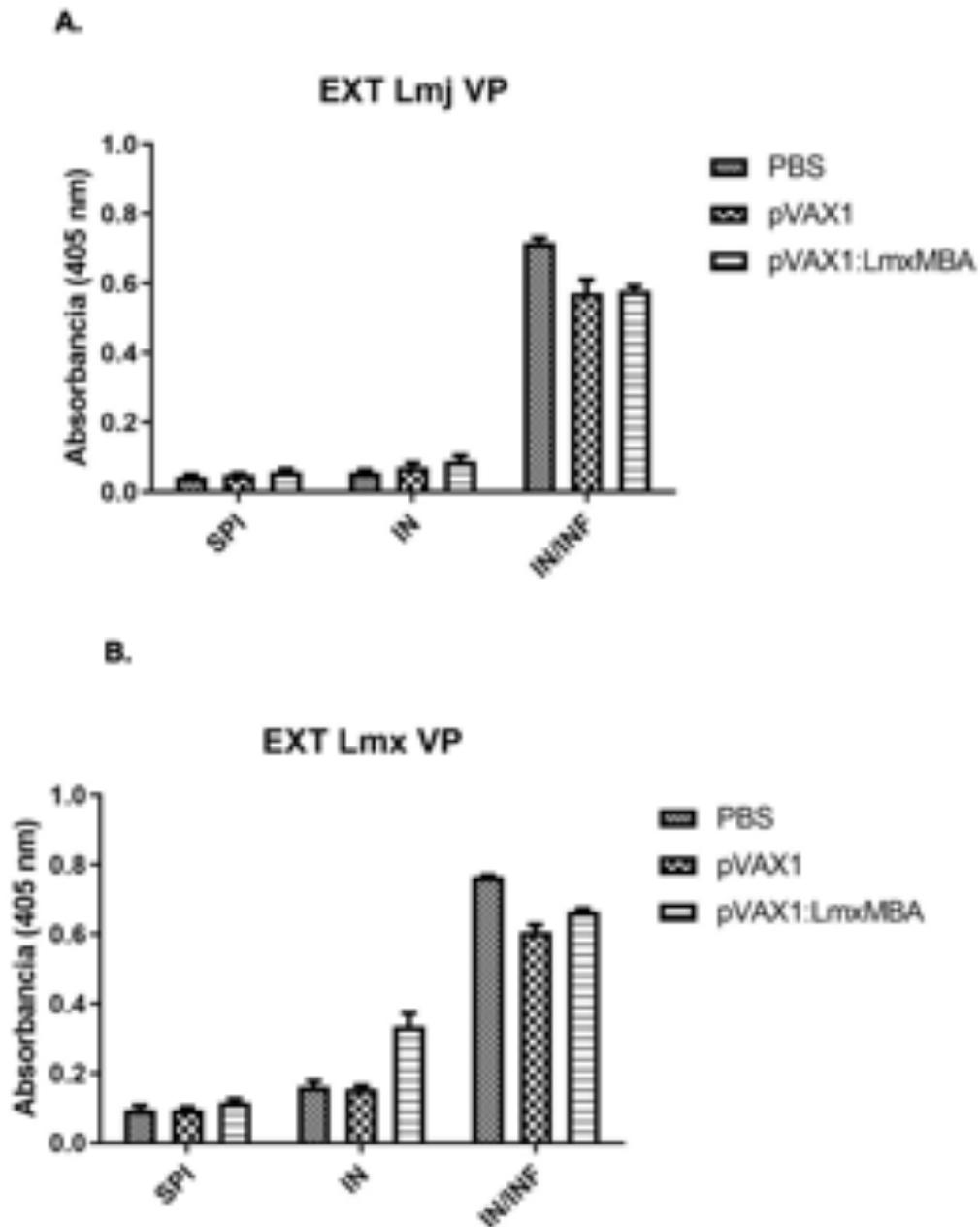


Figura 14. Determinación de anticuerpos anti-Lmx por ensayos de ELISA en vacunación profiláctica. (A) Ensayo de ELISA usando como antígeno extractos de promastigotes de *L. mexicana* **(B)** Ensayo de ELISA usando como antígeno extractos de promastigotes de *L. major*. Las muestras fueron ensayadas por triplicados.

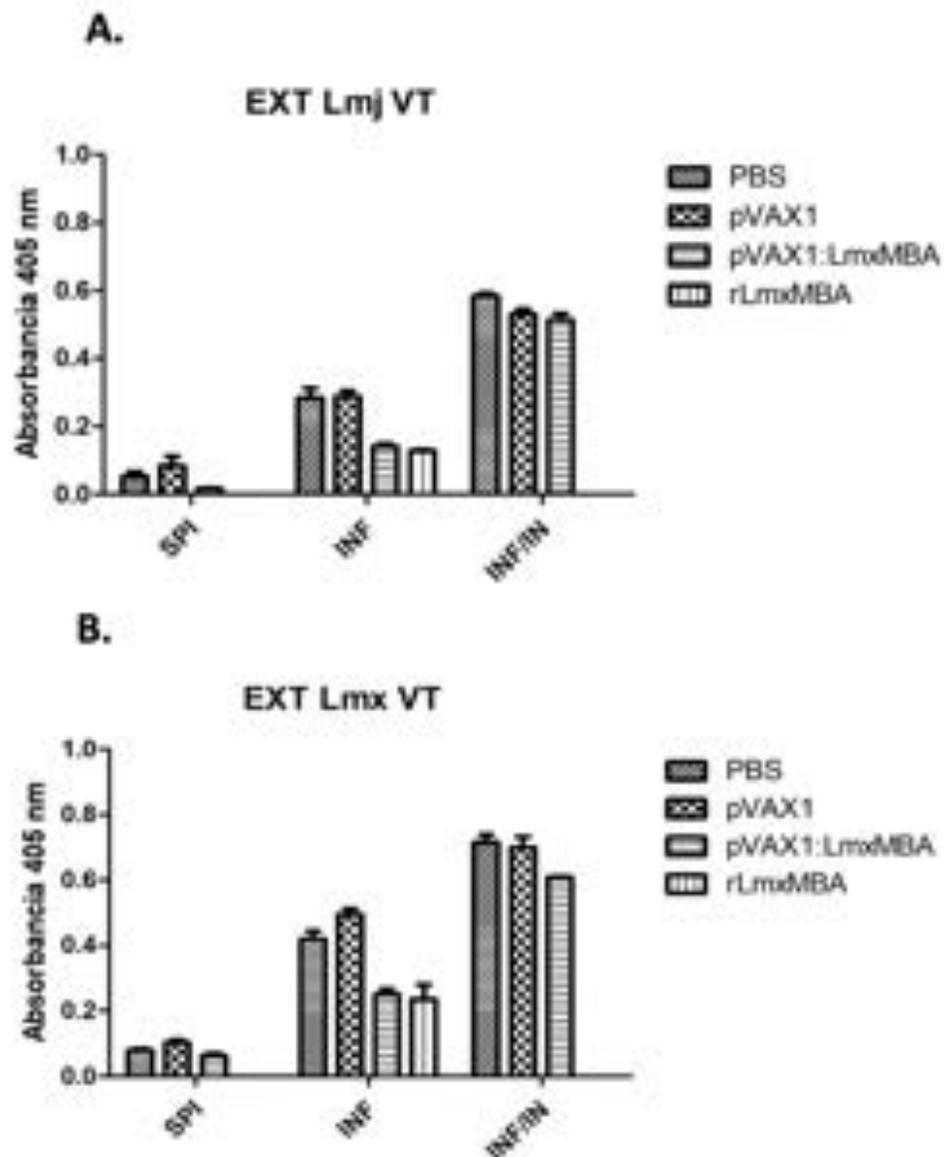


Figura 15. Determinación de anticuerpos anti-Lmx por ensayos de ELISA en vacunación terapéutica. (A) Ensayo de ELISA usando como antígeno extractos de promastigotes de *L. mexicana* **(B)** Ensayo de ELISA usando como antígeno extractos de promastigotes de *L. major*. Las muestras fueron ensayadas por triplicados de 4 animales por grupo.

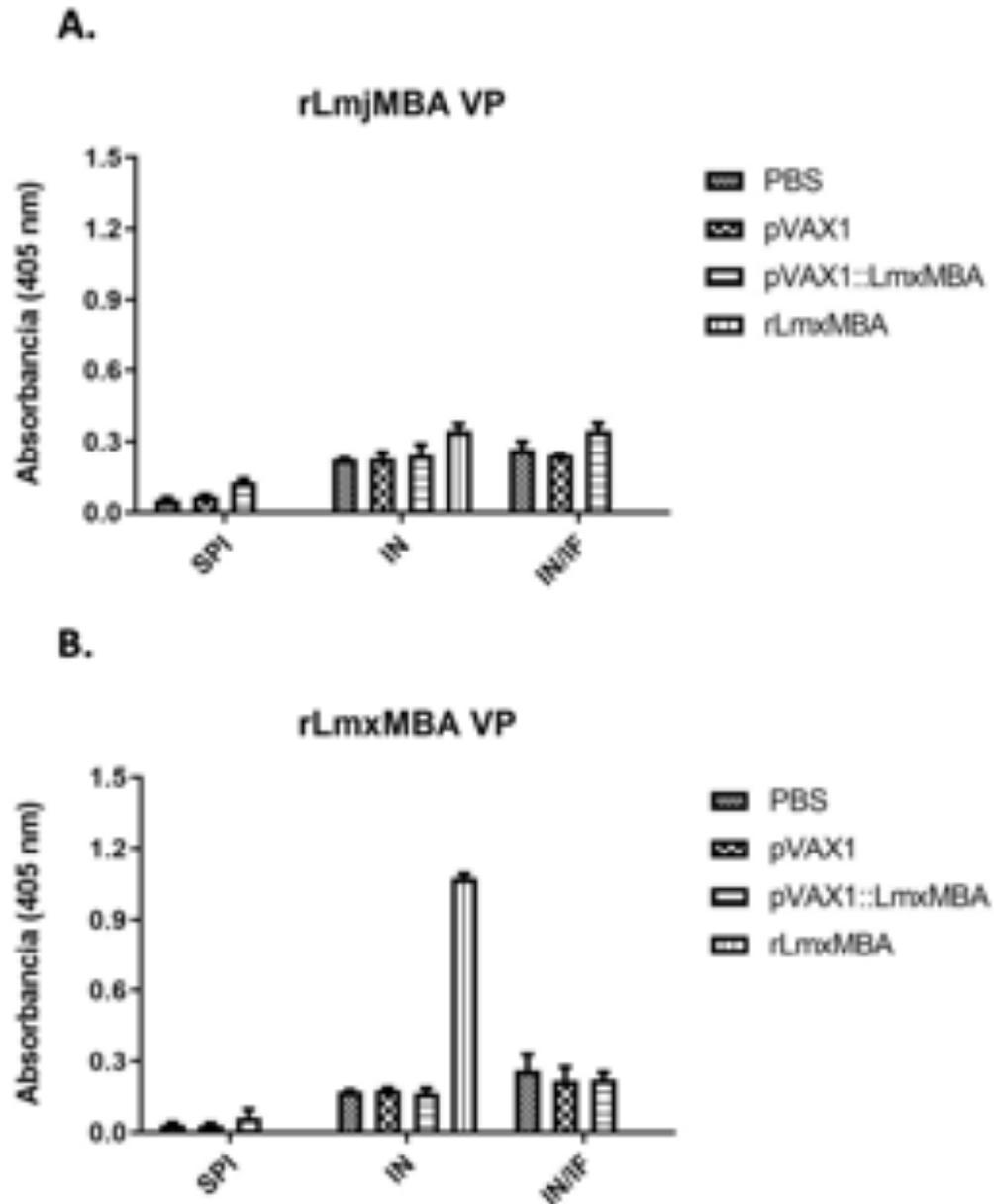


Figura 16. Determinación de anticuerpos anti-MBA por ensayos de ELISA en vacunación profiláctica. (A) Ensayo de ELISA usando como antígeno la proteína recombinante MBA de *L. major* **(B)** Ensayo de ELISA usando como antígeno la proteína recombinante MBA de *L. mexicana*. Las muestras fueron ensayadas por triplicado de 4 animales por grupo.

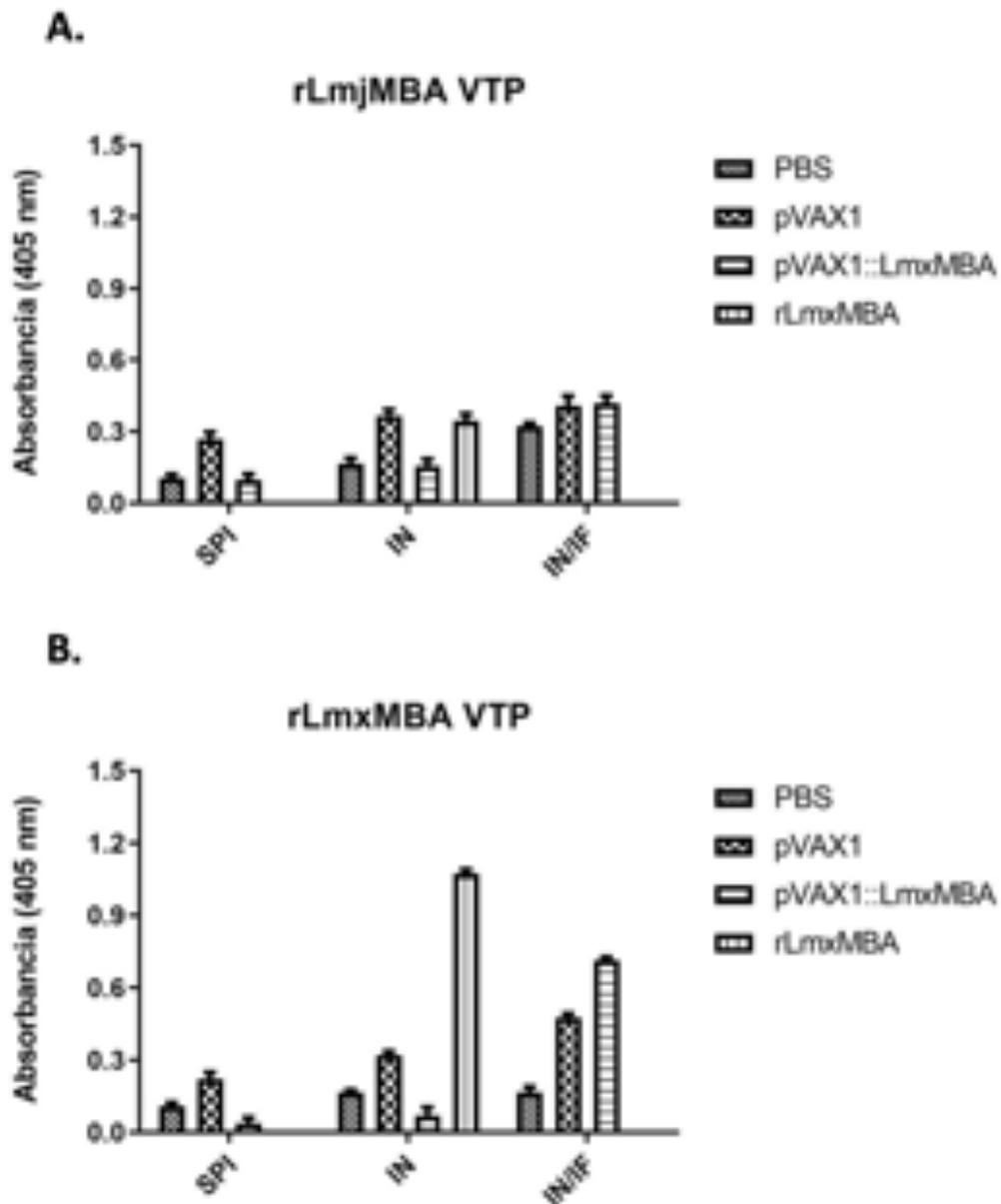


Figura 17. Determinación de anticuerpos anti-MBA por ensayos de ELISA en vacunación terapéutica. (A) Ensayo de ELISA usando como antígeno la proteína recombinante MBA de *L. major* (B) Ensayo de ELISA usando como antígeno la proteína recombinante MBA de *L. mexicana*. Para ambos ensayos se usó un anticuerpo anti-rLmxMBA como control. Las muestras fueron ensayadas por triplicado de 4 animales por grupo.

DISCUSIÓN

Durante muchas décadas, se ha utilizado la estrategia profiláctica tradicional con respecto al control de vectores con insecticidas en aerosol, el control de roedores con cebos envenenados, el manejo ambiental y el control de reservorios domésticos contra la leishmaniasis. Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha podido disminuir efectivamente el número de casos caninos y humanos^{45, 57}. Así, el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención de la enfermedad se ha convertido en una alta prioridad. En este contexto, el desarrollo de vacunas para *Leishmania* se convierte en una herramienta prometedora para la profilaxis en áreas endémicas, con un impacto potencial en la epidemiología de la enfermedad. Existe un consenso de que la respuesta inmunitaria Th1 desempeña un papel fundamental no solo en la protección contra la infección primaria, sino también en la promoción de una inmunidad de por vida contra la reinfección por *Leishmania*. Las células T, es decir, los linfocitos T CD4+, son cruciales en la protección inmune al producir varias citoquinas importantes asociadas con la inmunidad, como el IFN- γ y el TNF- α . Por lo tanto, una vacuna ideal debería promover una respuesta Th1 fuerte contra los parásitos de *Leishmania*⁵⁷.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la vacunación con el ADN del gen *LmxMBA* contra la infección por *Leishmania major* en ratones. Se decidió usar *MBA* amplificado del ADN genómico de *Leishmania mexicana* porque haciendo un análisis bioinformático se evidenció que el gen *MBA* está altamente conservado entre las especies de *Leishmania* y que compartían más del 90% de la secuencia aminoacídica codificada. Sin embargo, al evaluar el efecto profiláctico de la vacunación en ratones BALB/c con el plásmido pVAX1::*LmxMBA* no hubo protección al infectar con promastigotes de *L. major*. De igual forma se evaluó el efecto terapéutico que podría ejercer en ratones infectados previamente con promastigotes de *L. major*. Los resultados mostraron que la vacunación con el ADN plasmídico pVAX1::*LmxMBA* no revirtió los signos clínicos de la LC en el cojinete plantar de los ratones.

Al realizar los ensayos de ELISA para determinar la producción de anticuerpos contra los extractos de promastigotes de *L. major* y contra extractos de promastigotes de *L. mexicana*, se observó que después de la infección en la vacunación profiláctica los títulos de anticuerpos totales eran ligeramente más altos contra los extractos de promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos de ELISA contra la proteína recombinante MBA de cada especie para determinar la producción de anticuerpos específicos anti-MBA, los resultados obtenidos sugieren que los anticuerpos anti-MBA generados por la inmunización con el ADN plasmídico pVAX1::LmxMBA y los producidos después de la infección no son los mismos, lo que indica que los anticuerpos que se crearon son contra la proteína nativa LmxMBA y no contra la proteína LmjMBA, es decir, estas proteínas son diferentes. Por lo que se puede concluir que la protección contra la LC está mediada por una respuesta inmune antígeno específica. Estos resultados se corroboran con la predicción de epítomos realizada por análisis bioinformático para ambas proteínas, en el que se muestran algunos epítomos compartidos tanto para linfocitos T como para linfocitos B, sin embargo, entre las secuencias de ambas especies existen cambios en algunos aminoácidos. Con estos resultados se demuestra que los epítomos conservados no son los responsables de la protección. Además, en ensayos de ELISA se probaron sueros anti-rLmxMBA contra las proteínas recombinantes rLmjMBA y rLmxMBA, en donde se observó un reconocimiento 10 veces más bajo con la proteína rLmjMBA comparado con la proteína rLmxMBA. Esto podría explicar el que el nivel de anticuerpos posiblemente se deba a que después de la infección por *L. major* se estén formando inmunocomplejos con los anti-LmxMBA generados por la vacunación profiláctica con la proteína MBA nativa producida por el parásito o con el parásito mismo después de la infección. En el caso de la etapa de amastigotes de *Leishmania*, se ha demostrado que los parásitos recubiertos con IgG del hospedero podrían unirse a los receptores Fc (FcγR) en macrófagos para facilitar la entrada en estas células. Este compromiso y la entrada subsiguiente activan vías de señalización descendentes que impiden la muerte y promueven el crecimiento de parásitos intracelulares^{58, 59}.

Por otra parte, se evaluó el efecto terapéutico que ejerce la vacunación con pVAX1::LmxMBA contra la infección establecida por promastigotes de *L. major*. Los resultados mostraron que los ratones infectados no tuvieron mejoría en la lesión causada por la infección previa. Es decir, no se revirtieron los signos y síntomas clínicos de la LC por *L. major* y la lesión evolucionó en tiempo y forma. De igual manera, se determinó la producción de anticuerpos en estos ratones por el método de ELISA usando los extractos de promastigotes de *L. major*, en donde los niveles de anticuerpos que se obtuvieron fueron menores que los obtenidos con extractos de promastigotes de *L. mexicana*. Cuando se emplearon las proteínas recombinantes MBA de cada una de las especies como antígeno para los ensayos de ELISA, los niveles de anticuerpos contra la proteína recombinante rLmjMBA fueron menores en comparación con los niveles observados con la proteína recombinante rLmxMBA en el grupo de animales inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA, es decir, los anticuerpos que se generan son específicos para rLmxMBA y estos pueden no estar mediando la resolución de la enfermedad.

Una de las razones por las cuales se obtuvieron estos resultados tanto en la vacunación profiláctica como en la vacunación terapéutica, podría ser por la dosis de infección que se empleó para ambas condiciones. En nuestro laboratorio no se tenía estandarizado en tiempo y forma la evolución de la lesión de la LC causada por *L. major*, razón por la cual nos dimos a la tarea de evaluar la evolución de la lesión causada por esta especie infectando a ratones BALB/c con dosis altas de promastigotes en cultivo de *L. major* (5×10^6 y 2×10^6) los cuales ocasionaron una inflamación en el cojinete plantar más pronunciada, ulcerativa y necrótica a los 30 días de infección en comparación con ratones infectados con dosis bajas de promastigotes en cultivo de *L. major* (1×10^5 y 5×10^4) cuyo grupo de ratones al días de sacrificio (día 50 post-infección) no presentaron signos clínicos de LC. De igual forma se infectaron ratones con dosis intermedias de promastigotes en cultivo de *L. major* (5×10^5 y 1×10^6) cuyas lesiones se presentaron entre los días 23 y 30 post-infección y comparando la lesión que al término de esos días presentaron los ratones infectados con dosis más altas, la lesión había progresado menos y por ello había menos ulceración. Decidimos usar la dosis de 1×10^6 de promastigotes en

cultivos para infectar y/o desafiar a los ratones en los siguientes experimentos ya que los resultados obtenidos en los dos experimentos independientes con la dosis de 5×10^5 , no se replicó la evolución de la lesión en los ratones. Sin embargo, se ha reportado que empleando dosis altas de infección con promastigotes de *L. major* el tipo de respuesta que se genera es de tipo Th2 y esta conduce a la no eliminación del parásito y a la diseminación de la enfermedad⁶⁰. Esto debido a que, durante la infección en los macrófagos del hospedero, los amastigotes tienen la capacidad de inhibir la señalización del IFN- γ y la cual es una citocina crucial para la eliminación de los parásitos intracelulares. Además, *L. major* tiene la capacidad de impedir la producción temprana de IL-12 en las células infectadas cuya función es polarizar una respuesta inmunitaria adaptativa de tipo Th1, donde los mecanismos efectores están mediados por células que producen citocinas capaces de activar a los macrófagos y eliminar parásitos intracelulares⁵⁹. Además de esto, *L. major* puede inducir la producción de IL-4 e IL-10 en los macrófagos infectados alterando la señalización que conduce a la activación de los macrófagos por la ruta alternativa que se caracteriza por una menor expresión de la sintasa de óxido nítrico⁶¹, todo esto conduce a la progresión de la enfermedad.

Estudios han implementado la vacunación con ADN en ratones BALB/c contra la leishmaniasis, pero estos no han demostrado que el control de la infección se lograra efectivamente de manera sostenida inmunizando ratones con el ADN recombinante que codifica para la proteína GP63⁶². Sin embargo, la inmunidad conferida por el ADN de LACK se mantuvo durante al menos 20 semanas después de la infección y proporcionó inmunidad sistémica efectiva en un sitio distante del punto de vacunación. Además, estudios previos utilizando la proteína LACK o antígenos solubles (ASL) combinados con rIL-12 mostraron eficacia protectora cuando los animales se infectaron 2 semanas después de la última vacunación^{53, 63}.

Se ha demostrado que la inmunización con ADN plasmídico induce inmunidad protectora en una variedad de modelos experimentales de infección como lo ha sido la vacunación con el ADN plasmídico en ratones que codifica la proteína

circumsporozoita de *Plasmodium yoelii* cuya inmunización indujo niveles más altos de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos⁶⁴.

La vacunación con ADN se ha convertido en una estrategia efectiva para el desarrollo de vacunas contra el cáncer, incluido el carcinoma cervical (CC). La formación de CC está asociada con la infección por el virus del papiloma humano VPH. En este contexto, se informó que la vacunación terapéutica con el ADN que codifica para la oncoproteína truncada E6 del VPH tipo 16, se disminuye la degradación de p53, gen regulador del ciclo celular⁶⁵. De igual forma, el ADN plasmídico, los liposomas y las formulaciones de vesículas de membrana son algunos ejemplos de tecnologías utilizadas, con resultados alentadores en la respuesta protectora contra *Mycobacterium tuberculosis*^{66, 67}. Así, como para otros microorganismos intracelulares como el Virus de la inmunodeficiencia humana o el Virus de la hepatitis C se han estado desarrollado vacunas basadas en ADN⁶⁸.

Otra de las formas clínicas de la leishmaniasis es la Leishmaniasis visceral, contra esta patología ya se han aprobado vacunas de primera generación (tales como Leishmune ® y CaniLeish ®) las cuales han demostrado una inmunidad protectora del 79.3% en perros 12 meses después de la vacunación⁶⁹ y una protección del 63%⁷⁰ respectivamente. Estas y otras vacunas han sido aprobadas en Europa para la prevención de la leishmaniasis canina, sin embargo, hasta la fecha no hay una vacuna disponible que contenga o prevenga ninguna de estas formas clínicas en humanos.

13. CONCLUSIONES

1. Se determinó que con 1×10^6 de promastigotes en cultivo de *L. major*, entre los días 23-30 se establece la infección en el cojinete plantar de los ratones hembras BALB/c no ulcerativa.
2. Usando dosis más alta de parásitos se genera una lesión progresiva, ulcerativa y necrótica a los 30 días de infección.
3. La vacunación previa (profiláctica) con el DNA plasmídico pVAX1::LmxMBA no indujo una protección contra *L. major* en el modelo animal.
4. 20 días después de la primera inmunización en los ratones previamente infectados con *L. major* (vacunación terapéutica), pVAX1::LmxMBA no retrasó la evolución de la lesión en el cojinete plantar de los animales.
5. Los niveles de anticuerpos producidos contra la proteína rLmjMBA fueron menores que los observados contra rLmxMBA, tanto en la vacunación profiláctica como en la terapéutica.

14. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto terapéutico y profiláctico usando el ADN plasmídico pVAX1::*Lm*MBA contra *L. major*.
2. Analizar por microscopia la presencia y/o localización de la proteína MBA nativa tanto en los promastigotes como amastigotes de *L. major*.
3. Analizar la respuesta inmune generada por la infección antes y después de la vacunación profiláctica y terapéutica por medio de la isotipificación de los anticuerpos generados por la vacunación con el ADN plasmídico.
4. Realizar detección de citosinas producidas por la infección antes y después de la vacunación profiláctica y terapéutica.
5. Disminuir la dosis de infección o desafío en vacunación profiláctica y terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., the WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
2. Bahrami, F., Harandi, A. M., & Rafati, S. (2018). Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 222. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>
3. 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.
4. Garcia, L. S. (2006). *Diagnostic medical parasitology*. American Society for Microbiology Press.
5. Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana
6. Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A., & Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 83(4), 683-686.
7. Turco, S. J., & Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 65-92.
8. Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., & Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970-974.
9. Russell, D. G., & Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2613-2620.

10. Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology*, 28(8), 335-344.
11. Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., ... & Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1301-1310.
12. Rebollar Téllez, E. A. (1995). *Bionomía de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniasis cutánea localizada en el área endémica del Ejido La Libertad, Escárcega, Campeche, México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
13. ter Horst, R., Collin, S. M., Ritmeijer, K., Bogale, A., & Davidson, R. N. (2008). Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 46(11), 1702-1709.
14. Okwor, I., & Uzonna, J. E. (2013). The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunologic research*, 56(1), 163-171.
15. Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M., & El-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 3(2), 87-98.
16. Antinori, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Acquaviva, V., Foschi, A., & Meroni, L. (2007). Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *British Journal of Dermatology*, 157(5), 1032-1036.
17. David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22(6), 491-502.
18. Brodskyn, C. I., & de Oliveira, C. I. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in immunology*, 3, 145.
19. Calvopina, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge—a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663-672.

20. Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., & Ileri, A. (2009). Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of medicinal chemistry*, 52(8), 2603-2612.
21. Barratt, G., & Legrand, P. (2005). Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Current opinion in infectious diseases*, 18(6), 527-530.
22. Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., & Kumari, P. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9764), 477-486.
23. Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., & Kroeger, A. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5), 466-470.
24. Ben Salah, A., Ben Messacud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben Alaya, N., Bettaieb, J., & Abdelhamid, K. (2013). Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 368(6), 524-532.
25. Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., & Berman, J. (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 341(24), 1795-1800.
26. Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K., & Rai, M. (2006). Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(Supplement_1), S26-S33.
27. Gonzalez, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Ahar, J., & Tweed, J. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.

28. Alrajhi, A. A., Ibrahim, E. A., De Vol, E. B., Khairat, M., Faris, R. M., & Maguire, J. H. (2002). Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal of Medicine*, 346(12), 891-895.
29. Ruiz, J. H., & Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, 29(12), 671-678.
30. Martínez-López, M., Soto, M., Iborra, S., & Sancho, D. (2018). *Leishmania* hijacks myeloid cells for immune escape. *Frontiers in Microbiology*, 9, 883.
31. Ribeiro, P. A., Dias, D. S., Lage, D. P., Costa, L. E., Martins, V. T., Tavares, G. S., & Machado-de-Ávila, R. A. (2018). Evaluation of a *Leishmania* hypothetical protein administered as DNA vaccine or recombinant protein against *Leishmania infantum* infection and its immunogenicity in humans. *Cellular immunology*.
32. Shah, M. A. A., Ali, Z., Ahmad, R., Qadri, I., Fatima, K., & He, N. (2015). DNA mediated vaccines delivery through nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(1), 41-53.
33. González-Valdez, J., Aguilar-Yáñez, J. M., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2013). DNA based vaccines offer improved vaccination supply for the developing world. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(6), 979-982.
34. Mayrink, W., Mendonça-Mendes, A., de Paula, J. C., Siqueira, L. M. V., Marrocos, S. D. R., Dias, E. S., & Machado-Coelho, G. L. L. (2013). Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(4), 212-219.
35. Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., & Reed, S. G. (2013). Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 31, B244-B249.
36. Soudi, S., Hosseini, A. Z., & Hashemi, S. M. (2011). Co-administration of rectal BCG and autoclaved *Leishmania major* induce protection in susceptible BALB/c mice. *Parasite immunology*, 33(10), 561-571.

37. Kedzierski, L. (2010). Leishmaniasis vaccine: where are we today?. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 177.
38. Delany, I., Rappuoli, R., & De Gregorio, E. (2014). Vaccines for the 21st century. *EMBO molecular medicine*, e201403876.
39. Hasson, S. S. A. A., Al-Busaidi, J. K. Z., & Sallam, T. A. (2015). The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(5), 344-353.
40. Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., & Reed, S. G. (2013). Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 31, B244-B249.
41. Noazin, S. (2011). *Evaluation of first-generation vaccines against human leishmaniasis and the implication of leishmanin skin test (LST) response in disease prevalence* (Doctoral dissertation, University_of_Basel).
42. Sinha, S., Sundaram, S., Singh, A. P., & Tripathi, A. (2011). A gp63 based vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Bioinformatics*, 5(8), 320.
43. Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 72.
44. Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., Najafabadi, A. R., Taslimi, Y., Vahabpour, R., & Rafati, S. (2011). Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against Leishmania major infection. *Journal of controlled release*, 153(2), 154-162.
45. Makrides, S. C. (Ed.). (2003). *Gene transfer and expression in mammalian cells*. Gulf Professional Publishing.
46. Brusic, V., & Petrovsky, N. (2005). Immunoinformatics and its relevance to understanding human immune disease. *Expert review of clinical immunology*, 1(1), 145-157.
47. Bambini, S., & Rappuoli, R. (2009). The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug discovery today*, 14(5-6), 252-260.

48. De Brito, R. C., Jamille, M. D. O., Reis, L. E., Vieira, J. F., Mathias, F. A., Roatt, B. M., & Reis, A. B. (2018). Peptide vaccines for Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 9.
49. Kowalczyk, D. W., & Ertl, H. C. J. (1999). Immune responses to DNA vaccines. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(5), 751-770.
50. Rafati, S., Ghaemimanesh, F., & Zahedifard, F. (2006). Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine*, 24(16), 3290-3297.
51. Olobo, J. O., Anjili, C. O., Gicheru, M. M., Mbatia, P. A., Kariuki, T. M., Githure, J. I., & McMaster, W. R. (1995). Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania major* surface glycoprotein'(gp63). *Veterinary parasitology*, 60(3-4), 199-212.
52. Soudi, S., Hosseini, A. Z., & Hashemi, S. M. (2011). Co-administration of rectal BCG and autoclaved *Leishmania major* induce protection in susceptible BALB/c mice. *Parasite immunology*, 33(10), 561-571.
53. Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N., & Seder, R. A. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine*, 186(7), 1137-1147.
54. Maspi, N., Ghaffarifar, F., Sharifi, Z., Dalimi, A., & Khademi, S. Z. (2017). DNA vaccination with a plasmid encoding LACK-TSA fusion against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *The Malaysian journal of pathology*, 39(3), 267-275
55. Campos-Neto, A., Webb, J. R., Greeson, K., Coler, R. N., Skeiky, Y. A. W., & Reed, S. G. (2002). Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infection and immunity*, 70(6), 2828-2836.

56. Burgos-Reyes, (2016). Evaluación del efecto terapéutico generado por la vacunación con la proteína rLmxMBA y con el gen que la codifica en un modelo murino de leishmaniasis cutánea localizada. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional, unidad Zacatenco. Ciudad de México, México.
57. De Brito, R. C., Jamille, M. D. O., Reis, L. E., Vieira, J. F., Mathias, F. A., Roatt, B. M., & Reis, A. B. (2018). Peptide vaccines for leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 9.
58. Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 747-754.
59. Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 83.
60. Bogdan, C., Debus, A., Sebald, H., Rai, B., Schäfer, J., Obermeyer, S., & Schleicher, U. (2019). Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Mouse Models for Resolution of Inflammation Versus Chronicity of Disease. In *Leishmania* (pp. 315-349). Humana Press, New York, NY.
61. Atri, C., Guerfali, F., & Lacuini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1801.
62. Xu, D. U., & Liew, F. Y. (1995). Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, 84(2), 173.
63. Alcolea, P. J., Alonso, A., Esteban, A., Peris, P., Cortés, A., Castillo, J. A., & Larraga, V. (2019). IL12 p35 and p40 subunit genes administered as pPAL plasmid constructs do not improve protection of pPAL-LACK vaccine against canine leishmaniasis. *PLoS one*, 14(2), e0212136.
64. Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., & Hoffman, S. L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite

protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), 9866-9870.

65. Poláková, I., Pokorná, D., Dušková, M., & Šmahel, M. (2010). DNA vaccine against human papillomavirus type 16: modifications of the E6 oncogene. *Vaccine*, 28(6), 1506-1513.
66. Sarmiento, M. E., Alvarez, N., Chin, K. L., Bigi, F., Tirado, Y., García, M. A., & Acosta, A. (2019). Tuberculosis vaccine candidates based on mycobacterial cell envelope components. *Tuberculosis*.
67. Liang, Y., Bai, X., Zhang, J., Song, J., Yang, Y., Yu, Q., & Wu, X. (2016). Ag85A/ESAT-6 chimeric DNA vaccine induces an adverse response in tuberculosis-infected mice. *Molecular medicine reports*, 14(2), 1146-1152.
68. Hammer, S. M., Sobieszczyk, M. E., Janes, H., Karuna, S. T., Mulligan, M. J., Grove, D., & Frahm, N. (2013). Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *New England Journal of Medicine*, 369(22), 2083-2092.
69. Saraiva, E. M., de Figueiredo Barbosa, A., Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Nico, D., Souza, L. O. P., & Menz, I. (2006). The FML-vaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24(13), 2423-2431.
70. Bongiorno, G., Paparcone, R., Manzillo, V. F., Oliva, G., Cuisinier, A. M., & Gradoni, L. (2013). Vaccination with LIESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—A preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4), 691-695.

