



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON ADN QUE CODIFICA PARA EL ANTÍGENO  
*LmxMBA* DE *Leishmania mexicana* EN EL MODELO MURINO DE  
LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA

T E S I S

Que presenta

M. en C. MARÍA ANGÉLICA BURGOS REYES

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de tesis

DR. JOSÉ LUIS ROSALES ENCINA

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Luis Rosales Encina, en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN y bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamas Rohana, Dr. Marco Antonio Vega López, Dr. Víctor Tsutsumi, Dr. Ricardo Mondragón Flores y Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CVU 636713).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Rosales por haberme recibido en su laboratorio, por su apoyo brindado a lo largo de estos años, por su valiosa asesoría, sugerencias y observaciones durante la realización de este proyecto.

A mis asesores: Dra. Patricia Talamas Rohana, Dr. Marco Antonio Vega López, Dr. Víctor Tsutsumi, Dr. Ricardo Mondragón Flores y Dr. Santiago Martínez Calvillo, por dedicar parte de su tiempo en la revisión de este trabajo y por las aportaciones que me hicieron para concluirlo.

A las auxiliares, Biol. Lidia Baylon Pacheco, por su enorme enseñanza, consejos y tiempo para las técnicas moleculares y manejo de animales de laboratorio; M. en C. Patricia Espíritu Gordillo, por su enseñanza y paciencia en la revisión de inmunofluorescencias y en los métodos estadísticos utilizados.

A mis compañeros del laboratorio 7 con quienes compartí gratos momentos: Alondra, Gandhi, Dayana.

A mi familia por el apoyo incondicional y comprensión durante estos años, por ser un ejemplo de perseverancia, dedicación, responsabilidad y respeto. A las personas importantes que se han adelantado, pero marcaron mi vida inspirándome a seguir adelante.



## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.	GENERALIDADES DEL PARÁSITO.....	5
2.1	Morfología.....	5
2.2	Ciclo de vida.....	6
3.	LEISHMANIASIS.....	7
3.1	Vector.....	7
3.2	Formas clínicas de la enfermedad.....	7
3.3	Epidemiología.....	8
3.4	Tratamiento.....	9
4.	RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>Leishmania</i> .....	10
5.	VACUNAS.....	12
5.1	Vacunas de primera generación.....	13
5.2	Vacunas de segunda generación.....	14
5.3	Vacunas de tercera generación.....	15
5.4	Modelos animales.....	21
5.5	Antígenos reversos.....	22
6.	ANTECEDENTES DIRECTOS.....	23
7.	JUSTIFICACIÓN.....	29
8.	OBJETIVOS.....	30
8.1	Objetivo general.....	30
8.2	Objetivos específicos.....	30
9.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
9.1	Material biológico.....	31
9.2	Microscopía de inmunofluorescencia.....	33

9.3	Microscopía inmunoeléctronica.....	33
9.4	Purificación de ADN plasmídico .....	34
9.5	Infección de animales con promastigotes de <i>L. mexicana</i> y esquemas de vacunación.....	36
9.6	Determinación de la carga parasitaria.....	37
9.7	Ensayo de proliferación celular .....	38
9.8	Análisis histológico.....	38
9.9	Determinación de isotipo de inmunoglobulinas .....	39
9.10	Análisis estadístico.....	39
10.	RESULTADOS .....	40
11.	DISCUSIÓN.....	60
12.	PERSPECTIVAS .....	67
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	68

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Leishmania*, para la cual no hay una vacuna de uso humano disponible. En este estudio primero se determinó la localización subcelular de la proteína LmxMBA en los parásitos y posteriormente se evaluó su gen como un candidato vacunal en dos modelos animales de leishmaniasis cutánea localizada. Para evaluar el efecto de la vacunación profiláctica, ratones BALB/c fueron inmunizados con el gen LmxMBA e infectados con promastigotes de *L. mexicana*. Posterior a la inmunización y reto parasitario se observó un menor tamaño de la lesión plantar y una menor carga parasitaria en los animales inmunizados con pVAX1::LmxMBA en comparación con los grupos control. La tinción histológica reveló baja presencia de infiltrados inflamatorios y pocos amastigotes en la dermis de los animales inmunizados con el gen LmxMBA. De manera similar, la vacunación terapéutica con ADN de animales previamente infectados con *L. mexicana* generó una mejoría clínica y parasitológica tanto en ratones BALB/c genéticamente susceptibles como en hámsteres. Además de desacelerar la evolución de la lesión a úlcera, se evidenció menor daño tisular a nivel microscópico y cantidades bajas o indetectables del parásito en el tejido infectado. La vacunación profiláctica y terapéutica promovió una mejora en las manifestaciones clínicas macroscópicas y microscópicas que estuvo respaldada por una respuesta inmunitaria caracterizada con el aumento en la proporción IgG2a / IgG1 > 1 y una mayor tasa de proliferación de linfocitos específicos de antígeno. Estos resultados indican que la vacuna con el gen candidato podría proporcionar un medio para controlar la leishmaniasis cutánea, ya sea mediante la inmunización de la población humana en riesgo o mediante la inmunización del reservorio canino doméstico para reducir la transmisión a los seres humanos.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by the protozoan parasite *Leishmania*, for which there is no vaccine available. In this study, the subcellular location of the LmxMBA protein was first determined in the parasites, and subsequently its gene was evaluated as a vaccine candidate in two animal models of localized cutaneous leishmaniasis. To evaluate the effect of prophylactic vaccination, BALB/c mice were immunized with LmxMBA gene and infected with *L. mexicana* promastigotes. After immunization and parasite challenge, smaller plantar lesion size and a lower parasite load were observed in animals immunized with pVAX1::LmxMBA compared to the control groups. Histological staining revealed a low presence of inflammatory infiltrates and a low presence of amastigotes in the dermis of animals immunized with the LmxMBA gene. Similarly, therapeutic vaccination with DNA of animals previously infected with *L. mexicana* generated clinical and parasitological improvement in genetically susceptible BALB/c mice and hamsters. In addition to slowing down the lesion's evolution to an ulcer, less tissue damage was observed at the microscopic level and low or undetectable amounts of the parasite in the infected tissue. Prophylactic and therapeutic vaccination improved the macroscopic and microscopic clinical manifestations supported by an immune response characterized by a IgG2a/IgG1 ratio > 1 and a higher rate of proliferation of antigen-specific lymphocytes. These results indicate that the candidate gene vaccine could provide a mean to control cutaneous leishmaniasis, either by immunizing the human population at risk or by immunizing the domestic canine reservoir to reduce transmission to humans.

## 1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania*. Se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembra del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.

La leishmaniasis tiene 4 formas clínicas de presentación: leishmaniasis cutánea, visceral, mucocutánea y difusa. Es una enfermedad endémica en 97 países y se considera una enfermedad tropical desatendida. Un total de mil millones de personas que viven en áreas endémicas corren el riesgo de contraer la enfermedad y hay al menos 12 millones de casos de las diversas formas de leishmaniasis en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, se estiman aproximadamente 300,000 casos de leishmaniasis visceral y alrededor de 20,000 muertes anuales. En cuanto a leishmaniasis cutánea, durante el periodo 2007- 2012 se habían reportado un total de 1 millón de casos <sup>1</sup>.

Los tratamientos actuales contra esta enfermedad son insuficientes y consisten principalmente en quimioterapia capaz de producir efectos tóxicos severos a nivel hepático y renal. Además, los tratamientos se ven obstaculizados en gran medida por el alto costo de los medicamentos y la aparición de resistencia a los fármacos anti-*Leishmania*. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna o nuevos fármacos que puedan prevenir la aparición y reducir la propagación de la enfermedad es necesario para mitigar los efectos de dicha parasitosis en la salud pública, economía y sociedad <sup>2,3</sup>.

## 2. GENERALIDADES DEL PARÁSITO

### 2.1 Morfología

*Leishmania* es un protozoo intracelular obligado dimórfico; los dos estadios de desarrollo en su ciclo de vida son el promastigote y el amastigote.

El promastigote tiene forma fusiforme o alargada. Mide 10 - 20  $\mu\text{m}$ , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25  $\mu\text{m}$ . El amastigote

tiene forma redondeada u ovalada, mide 2 - 4  $\mu\text{m}$ , carece de membrana ondulante y posee un resto de flagelo que no emerge de la célula, por lo cual es inmóvil. Reside y se multiplica en los fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel <sup>4</sup>.

## **2.2 Ciclo de vida**

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado para alimentarse e ingiere macrófagos parasitados con amastigotes de *Leishmania*. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal y después de la replicación en el intestino del insecto vector, los promastigotes migran al esófago y faringe. En la probóscide, los promastigotes procíclicos se transforman en promastigotes metacíclicos, el estadio infectivo <sup>4,5</sup>.

Cuando el vector infectado pica a un hospedero, inocula entre 10 y 100 promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide y éstos penetran en la dermis. Aunque muchos promastigotes son destruidos por leucocitos polimorfonucleares, algunos se transforman en amastigotes en las células del sistema fagocítico mononuclear (incluyendo macrófagos, monocitos y células de Langerhans); y en los fagolisosomas pierden el flagelo y se transforman en amastigotes <sup>4,6</sup>.

Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que ocasiona la distensión y ruptura del macrófago. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocítico mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se completa cuando el flebótomo pica a un hospedero para alimentarse de sangre e ingiere células parasitadas (Figura 1) <sup>4</sup>.

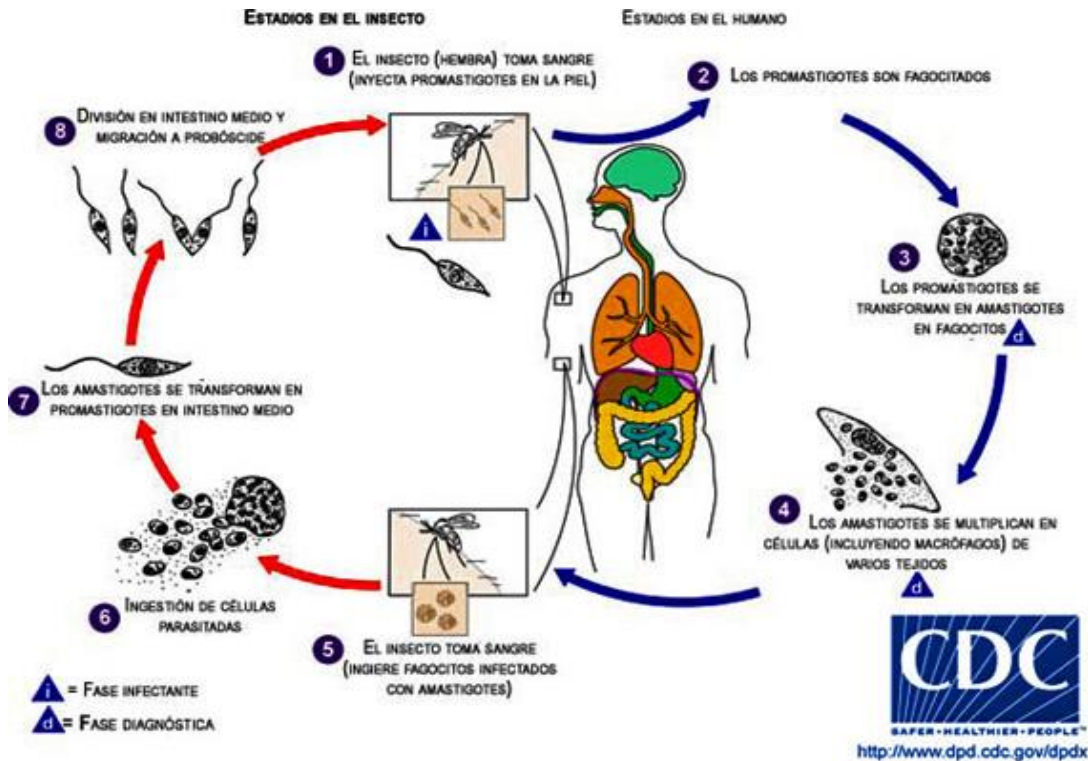


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. <sup>7</sup>.

### 3. LEISHMANIASIS

#### 3.1 Vector

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de flebotomos, insectos que abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano en las zonas templadas, conocidos como moscas de la arena. Los mosquitos miden de 1.5 a 3 mm de longitud, su cuerpo está cubierto de pelos y tiene las alas erectas en forma de 'V'. Su forma de vuelo es muy particular, a manera de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso <sup>8-10</sup>.

#### 3.2 Formas clínicas de la enfermedad

##### Leishmaniasis cutánea

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

incapacidad grave. La úlcera característica es redondeada, de borde elevado y bien definido, indurada, y puede estar cubierta por una costra amarillenta. Cuando afecta pabellones auriculares produce una úlcera crónica, progresiva, de fondo exudativo, generalmente indolora, que puede ser mutilante si no se aplica el tratamiento adecuado <sup>7,10</sup>.

### **Leishmaniasis mucocutánea**

En la leishmaniasis mucocutánea (LM) las lesiones pueden conducir a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y las cavidades de la garganta y los tejidos circundantes. Es la forma más destructiva de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas se presentan meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea; y se deben a metástasis de lesiones cutáneas. Las lesiones se inician principalmente en la mucosa nasal, simulando una rinitis. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar y deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia <sup>7,11</sup>.

### **Leishmaniasis visceral**

La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como kala-azar, se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, inflamación del bazo, el hígado, y anemia. En países en desarrollo, los niños con algún grado de desnutrición y las personas VIH positivas son la población en mayor riesgo de adquirir la enfermedad progresiva. El tiempo de incubación es de meses, a veces años. Cuando se manifiesta la enfermedad, es grave y la mortalidad sin tratamiento es del 100 % <sup>7,10</sup>.

## **3.3 Epidemiología**

La leishmaniasis humana es endémica a nivel mundial en 97 países y 3 territorios, con la excepción de Australia y la Antártida. El número real de casos de la enfermedad es desconocido, debido a la falta de notificación a los sistemas de vigilancia epidemiológica, razón por la cual la mayoría de los datos de incidencia disponibles están basados en estimaciones <sup>8</sup>.

Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se registran en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia central. Se calcula

que los casos nuevos cada año oscilan entre 600 000 y 1 millón. Los principales agentes causales de la LC en América son *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Existen casos autóctonos en Texas, EUA y se considera endémica en toda Latinoamérica, hasta el norte de Argentina, con las excepciones de Chile y Uruguay. En México, las principales zonas endémicas se encuentran en Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz <sup>7,9-11</sup>.

En cuanto a la LM, se estiman alrededor de 35.000 casos anualmente principalmente en Brasil, Perú, Bolivia y Etiopía <sup>7-11</sup>.

La mayoría de los casos de LV se registran en el Brasil, África oriental y la India. Se calcula que anualmente se producen en todo el mundo entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral, de los que solo entre el 25% y el 45% se notifican a la OMS. La LV sigue siendo una de las principales enfermedades parasitarias con capacidad de generar brotes y muertes. En 2018, más del 95% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en 10 países: Brasil, China, Etiopía, India, Iraq, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán y Sudán del Sur<sup>7</sup>.

### **3.4 Tratamiento**

La primera opción terapéutica para los pacientes con leishmaniasis se basa en la administración intravenosa de antimonio pentavalente: antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio. La administración oral de miltefosina o la administración intravenosa de anfotericina B es una segunda posibilidad terapéutica. Sin embargo, estos fármacos tienen efectos adversos, como cardiotoxicidad, daño hepático, nefrotoxicidad o incluso teratogenicidad (después de la administración de miltefosina) <sup>3,12,13</sup>. Además, los esquemas de tratamiento prolongado (dosis diarias durante 3-4 semanas), la administración parenteral, el incumplimiento y el abandono del tratamiento prescrito conducen a la aparición de parásitos resistentes a los medicamentos<sup>12</sup>.

La resistencia a los medicamentos es crítica a nivel mundial. En la India, donde se presenta la mayor cantidad de casos de resistencia en leishmaniasis visceral del Viejo Mundo producidos por *L. donovani*, en menos de 20 años el antimoniato de

meglumina perdió el 60% de su eficacia, razón por la cual ya no se emplea como tratamiento de primera línea<sup>14</sup>.

Los efectos adversos leves y moderados de estos medicamentos incluyen mialgias y artralgias, dolor de cabeza, anorexia, náuseas, letargo, fiebre, arritmias, bradicardia, insuficiencia renal y está contraindicado en mujeres embarazadas, pacientes con problemas hepáticos cardiacos y renales <sup>10,15</sup>. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas alternativas terapéuticas que permitan la resolución de enfermedades y que sean más seguras para los pacientes en términos de una mejor adherencia al tratamiento y menos efectos tóxicos <sup>16,17</sup>.

#### **4. RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Leishmania***

La respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* inicia desde el momento de la picadura del vector. El sistema inmune innato interviene mediante la activación del complemento, la liberación de citocinas y la llegada de macrófagos residentes y de neutrófilos sanguíneos al sitio de la lesión. Esto podría limitar la capacidad del insecto para alimentarse y para transmitir la leishmaniasis, sin embargo, la saliva del insecto contiene sustancias vasodilatadoras: maxadilán (*Lutzomyia*) o adenosina (*Phlebotomus*), antiagregantes plaquetarios, y sustancias estimuladoras de la producción de prostaglandina E2 (PGE2), lo cual reduce la inflamación y facilita la transmisión del parásito <sup>5,18</sup>.

Una vez inoculados los promastigotes en la piel del hospedero, se da la activación de la cascada del complemento que lisa aproximadamente al 90% de los promastigotes metacíclicos inyectados, sin embargo, hay un 10% que sobrevive. El parásito contiene cinasas que fosforilan a C3, C5 y C9 provocando su inactivación. Moléculas de superficie del parásito como el lipofosfoglicano (LPG) y una glicoproteína de 63 kDa (gp63) o leishmanolisina, favorecen la unión de C3bi a la superficie del parásito y, de esta manera, su propia opsonización y posterior fagocitosis mediada por los receptores de complemento (CR) de los macrófagos <sup>19-21</sup>.

Los macrófagos residentes en el sitio de inoculación de los parásitos son las primeras células del hospedero en infectarse. Los macrófagos fagocitan los parásitos que resistieron la lisis por complemento mediante el receptor CD11b/CD18 y mediante el receptor de manosa-fucosa que se une a los residuos de manosa del LPG. El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva y favorecer la fagocitosis a través del receptor de dicha proteína, sin embargo, este mecanismo no provoca la activación del macrófago. Una vez en el interior del macrófago, los parásitos se transforman en amastigotes, inhiben la producción de IL-12 por el macrófago y se dividen activamente <sup>22</sup>.

Después de unas horas, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) llegan al sitio de la infección. Normalmente, los PMN tienen un período de vida corto y mueren rápidamente por apoptosis; sin embargo, el parásito es capaz de retrasar la apoptosis, incluso hasta varios días, lo que favorece la invasión y la persistencia del parásito en las células infectadas <sup>23</sup>.

La llegada de las células dendríticas al sitio de inflamación marca el inicio de la respuesta inmune adaptativa a la infección por *Leishmania*. Este evento se ha relacionado con el aumento de las concentraciones de IL-12, la migración de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ al compartimiento cutáneo, la muerte del parásito y la involución de la lesión clínica. Las células dendríticas fagocitan a los parásitos llevándose a cabo la presentación antigénica. Esta fagocitosis favorece la activación de las células dendríticas y aumenta la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) y de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas son las únicas células con capacidad de procesar el antígeno tanto por la vía del MHC-I como del MHC-II y, por lo tanto, al migrar a los ganglios linfáticos pueden activar a los linfocitos T CD4+ y a los T CD8+. En contraste, los macrófagos infectados sólo expresan bajas concentraciones de MHC-II y de moléculas coestimuladoras <sup>24,25</sup>.

El progreso de la infección, demostrado en el modelo de ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th1 o Th2. Una vez



en los ganglios linfáticos, las células dendríticas maduras activan linfocitos T y los estimulan para generar una respuesta de tipo Th1 mediante la secreción de grandes cantidades de IL-12. Además, la IL-1, IL-23 e IL-27 también contribuyen al desarrollo de la respuesta de tipo 1. Los linfocitos Th1 activados migran de regreso a la piel y allí interactúan con los macrófagos infectados. La secreción de IFN- $\gamma$  por estos linfocitos activa a los macrófagos parasitados y los estimula a producir óxido nítrico (NO) mediante la inducción de la sintasa inducible del NO (iNOS), favoreciendo la muerte de los parásitos intracelulares. Esta activación parece ser dependiente de la interacción entre CD40 y su ligando CD145. Además, el TNF- $\alpha$  y la IL-12 sinergizan con el IFN- $\gamma$  para activar a la iNOS<sup>25,26</sup>.

Por el contrario, la inducción de una respuesta de tipo Th2, y secreción de citocinas IL-4, IL-10, activan la arginasa 1 en los macrófagos con la consecuente degradación de la L-arginina en L-ornitina y urea. La L-ornitina es transformada por la ornitina descarboxilasa en putrescina, una poliamina, reduciendo la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO y aumento de la concentración de poliaminas, nutrientes esenciales para el crecimiento intracelular del parásito. Esto quiere decir que la respuesta Th2 no sólo evita la muerte del parásito, sino que le asegura nutrientes para favorecer su crecimiento<sup>27</sup>.

También se ha propuesto que las células T CD8 desempeñan un papel crucial en la resolución de la infección. Un conteo elevado de linfocitos T CD8 ha sido reportado en sangre y lesiones de pacientes infectados con *L. major* y *L. mexicana* y su papel protector se ha asociado con la producción de IFN- $\gamma$ . Además, se ha informado que el número de células T CD8 se reduce de manera importante en las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD) infectados con *L. mexicana*, en comparación con pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL)<sup>28</sup>.

## **5. VACUNAS**

El desarrollo y uso generalizado de vacunas contra una variedad de enfermedades infecciosas ha sido uno de los triunfos de la medicina. La protección inducida por la mayoría de las vacunas actuales esta mediada por respuestas inmunitarias

humorales de larga duración a través de la producción de anticuerpos, que son los principales agentes de protección inmunitaria contra una gran cantidad de los virus y bacterias. Sin embargo, no hay vacunas disponibles para infecciones como la tuberculosis, la malaria, la leishmaniasis y el VIH, en los que la protección depende más de la inmunidad mediada por células que de la inducción de anticuerpos (inmunidad humoral).

Las vacunas actualmente autorizadas, ya sean preparadas a partir de células muertas o inactivadas, proteínas recombinantes u organismos vivos atenuados, estimulan la producción de anticuerpos. Sin embargo, con la excepción de las vacunas preparadas a partir de organismos vivos atenuados, como la vacuna contra el virus varicela-zóster, las otras no generan primordialmente inmunidad celular. Además, la posibilidad de utilizar vacunas vivas atenuadas contra virus como el VIH despierta preocupación sobre los procedimientos de fabricación y los riesgos de utilizar estas vacunas para inmunizar a grandes poblaciones.

Diversos antígenos del parásito se han explorado como candidatos a vacuna contra la leishmaniasis. Estos antígenos incluyen parásitos vivos o muertos, parásitos atenuados (primera generación), proteínas recombinantes de *Leishmania* (segunda generación), el ADN que codifica proteínas de *Leishmania* (tercera generación), e inmunomoduladores. Actualmente no hay vacuna disponible para el ser humano contra la leishmaniasis, sin embargo, muchos investigadores continúan en la búsqueda de posibles candidatos. Los principales desafíos en el desarrollo de la vacuna contra la leishmaniasis son la complejidad asociada con la antigenicidad, la respuesta inmune del hospedero, el costo y la eficacia <sup>29-32</sup>.

### **5.1 Vacunas de primera generación**

Los parásitos muertos y vivos atenuados constituyen las vacunas de primera generación contra *Leishmania*. Parásitos atenuados por irradiación con rayos gama, promastigotes *knock out* para BT1 (*biopterin transporter*), amastigotes deficientes de SIR2 (*silent information regulator 2*), parásitos muertos por autoclave y administrados con o sin adyuvante, son algunos ejemplos de candidatos a vacuna de primera generación. Aunque las vacunas de primera generación proporcionan

cierto nivel de protección contra la leishmaniasis, desarrollan una respuesta inmune muy variable. Si bien las vacunas de microorganismos atenuados permiten la presentación eficaz del antígeno MHC de clase I que puede estimular las respuestas de las células T CD8 +, la capacidad de las vacunas vivas atenuadas para inducir respuestas específicas de Th1 en humanos está menos caracterizada y puede depender del patógeno específico. Desde un punto de vista de la seguridad, las vacunas atenuadas de organismos completos plantean varios problemas que pueden impedir su aplicación generalizada para ciertas enfermedades (malaria, leishmaniasis, VIH) <sup>33,34</sup>.

## **5.2 Vacunas de segunda generación**

Las vacunas de segunda generación incluyen proteínas del parásito purificadas, así como proteínas recombinantes de *Leishmania*. Leishmune® es una vacuna de segunda generación, que ha mostrado resultados prometedores en la leishmaniasis visceral canina. Esta vacuna ha sido autorizada en Brasil para proteger perros y de esta manera bloquear la transmisión de la enfermedad a los seres humanos a través de la picadura del mosquito vector. Leishmune® es un ligando fucosa-manosa (FML)–saponina, contiene la fracción purificada FML de promastigotes de *L. donovani* y saponinas como adyuvantes. Se observaron respuestas inmunológicas selectivas en los perros inmunizados con Leishmune® incluyendo cambios fenotípicos tempranos en los neutrófilos y los monocitos, la estimulación de células T CD8 +, y la inducción de respuesta proinflamatoria mediada por interferón- $\gamma$  <sup>30</sup>.

Además de la identificación del antígeno adecuado, otros parámetros importantes en el diseño de vacunas contra *Leishmania* son la liberación apropiada del antígeno y la inducción de respuesta inmune tipo Th1 específica. Las vacunas de segunda generación muestran una mejor respuesta en comparación con las de primera generación. Sin embargo, para aumentar la especificidad y la potencia de la vacunación, se han desarrollado vacunas de tercera generación, ADN que codifica para proteínas específicas del parásito.

### 5.3 Vacunas de tercera generación

Las vacunas de ADN son las vacunas de tercera generación basadas en preparaciones de plásmidos purificados que contienen transgenes que codifican proteínas antigénicas o péptidos capaces de desencadenar una respuesta inmune contra una amplia gama de enfermedades. Estas vacunas tienen características que confieren ventajas sobre otras tecnologías de vacunas en términos de seguridad, facilidad de fabricación y estabilidad <sup>35-37</sup>.

Las vacunas de ADN se basan en la administración directa de ADN plasmídico que codifica para el antígeno de un patógeno en el hospedero. En una vacuna de ADN, el gen del antígeno de interés se clona en un plásmido bacteriano que se modifica para aumentar la expresión del gen insertado en células de mamífero. Después de inyectarse en un animal, el plásmido ingresa a una célula hospedera, donde permanece en el núcleo, aunque no se integra en el ADN de la célula. Utilizando la maquinaria metabólica de la célula, el ADN plasmídico dirige la síntesis del antígeno que codifica. Un enfoque que implica la síntesis de antígeno dentro de las células tiene varias ventajas potenciales sobre la inmunización con proteínas recombinantes exógenas u organismos muertos. De tal manera que estos plásmidos funcionan como un sistema de transporte para el gen, resultando en la producción *in situ* del antígeno. La expresión endógena del antígeno, dentro de las células del hospedero, puede inducir una respuesta inmune celular y humoral. Esta respuesta incluye anticuerpos, aunque es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas de proteínas recombinantes, así como una activación de células T cooperadoras y citotóxicas <sup>38,39</sup>.

Las vacunas de ADN pueden inducir la presentación de antígenos a través de las vías del MHC de clase I y clase II, lo que lleva a la activación de células T cooperadoras CD4+ y citotóxicas CD8+ <sup>38,39</sup>. Las células presentadoras de antígenos "profesionales" desempeñan un papel fundamental en la inducción de la inmunidad al presentar péptidos de la vacuna en moléculas de MHC de clase I, después de la transfección directa o presentación "cruzada", y moléculas de MHC

de clase II después de la captura de antígenos y procesamiento dentro de la vía endocítica.

Además de la tecnología de la vacuna, la respuesta inmunitaria puede variar de acuerdo con muchos parámetros de inmunización, incluido el método de administración de la vacuna, la presencia de adyuvantes genéticos y el régimen de la vacuna. Las formas de administración dirigidas a la piel, ha demostrado que la inyección intradérmica (íd.), la biobalística y la aplicación tópica provocan una respuesta humoral principalmente, caracterizada por una rápida progresión a una respuesta de tipo Th2, asociada con la producción de anticuerpos IgA y un solo isotipo de IgG1<sup>40,41</sup>. Por el contrario, la inyección en el músculo da como resultado la inducción de una fuerte respuesta mediada por células, o tipo Th1, que ceba los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno y se asocia con la producción de anticuerpos IgG2a<sup>42</sup>.

Las vacunas de ADN han sido evaluadas en diferentes modelos animales y contra gran variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo enfermedades virales y parasitarias. Algunas vacunas terapéuticas candidatas contra el virus del papiloma humano (VPH) utilizan las oncoproteínas E6 y E7 como antígenos contra el VPH-16 y el VPH-18, que están presentes en el cáncer de cuello uterino y la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) asociados al VPH. Una estrategia de vacunación con ADN es el uso de antígenos fusionados que codifican múltiples antígenos en el mismo vector. Por ejemplo, las vacunas de ADN HPV-16 y HPV-18 E6 / E7, administradas por electroporación, demostraron resultados alentadores en ratones y primates no humanos, y actualmente se están evaluando en un ensayo clínico de fase I (*Inovio Pharmaceuticals*)<sup>43,44</sup>.

Más recientemente, la vacunación de macacos *Rhesus* con el gen que codifica la proteína S del CoV-2 mostró que los animales desarrollaron respuestas inmunitarias humorales y celulares protectoras cuando se enfrentaron al virus. Además, los animales mostraron reducciones en la mediana de las cargas virales en el lavado broncoalveolar y la mucosa nasal, en comparación con las cargas virales de los controles. También se observaron títulos de anticuerpos neutralizantes a niveles

similares a los observados en humanos que se han recuperado de la infección por SARS-CoV-2 <sup>45</sup>. Actualmente, se encuentran en ensayos clínicos de fase I/II/III ocho candidatos a vacunas de ADN diferentes contra el SARS-CoV-2 <sup>46</sup>.

Con respecto a las vacunas de tercera generación contra la leishmaniasis, en la tabla 1 se muestran algunos antígenos de *Leishmania* probados como candidatos a vacunas de ADN.

**Tabla 1. Antígenos de *Leishmania* probados como candidatos a vacunas de ADN** <sup>47</sup>

Antígeno candidato	Modelos	Enfermedad
gp63	Perro, Ratón	LV, LC
KMP11	Ratón, Hámster	LV, LC
CPB	Perro, Ratón	LV, LC
ORFF	Ratón	LV
PSA-2	Ratón	LC

Abreviaturas: gp63, glicoproteína 63; KMP11, proteína de membrana de kinetoplastido-11; CPB, cisteína proteinasa B; ORFF, open reading frame F; PSA2, antígeno de superficie de promastigotes-2.

El gen que codifica para gp63 fue el primero que se utilizó como vacuna de ADN, y los ratones inmunizados por vía intramuscular con pCMV-gp63 desarrollaron fuertes respuestas Th1 así como lesiones menos severas después de la infección por *L. major* <sup>48</sup>. Sin embargo, un estudio comparativo que evaluó diferentes candidatos a vacunas de ADN, incluida la gp63, mostró que la protección era transitoria (solo entre las semanas 4 y 8) y finalmente, los ratones inmunizados desarrollaron lesiones similares en tamaño a las observadas en los ratones controles <sup>49</sup>. En el mismo estudio, se observó como el candidato más prometedor al de la vacuna de ADN que codificaba el antígeno LACK. Aunque, incapaz de inducir una protección completa, la vacunación con el gen LACK indujo lesiones de menor tamaño comenzando en la cuarta semana después de la infección y en adelante, en comparación con los ratones control (PBS). Los otros candidatos a vacuna de ADN evaluados (p20, PSA-2, LeIF) no indujeron ninguna protección e incluso se asociaron con el agravamiento de la enfermedad <sup>49</sup>. Estudios previos mostraron que

el uso del antígeno de superficie de promastigote-2 (PSA-2) como vacuna profiláctica, resultaba en una protección significativa asociada con el tipo de respuesta inmune Th1. Sin embargo, la inducción de una respuesta Th2 simultánea anuló la función efectora de Th1 y la administración de ADN de IL-12 no mejoró el potencial vacunal de PSA-2 <sup>50,51</sup>.

Otros estudios revelaron que la vacunación con gp63-pcDNA-3 por vía intradérmica, protegió al 30% de los ratones susceptibles a la infección por *L. major* a pesar de la inducción de la respuesta Th1 por parte de todos los ratones, mientras que ni la proteína gp63 (0%) ni las vacunas de parásitos congelados y descongelados (0 %) fueron eficaces <sup>52</sup>.

La vacuna de ADN basada en la proteína de membrana kinetoplastid -11 (KMP11) de *L. donovani* confirió inmunidad contra cepas de *Leishmania* tanto sensibles como resistentes al antimonio en hámsteres dorados. Este estudio demostró que el antígeno KMP11 podría ser un prometedor candidato a vacuna contra la leishmaniasis visceral por el procesamiento y presentación de antígeno a través de la vía de MHC-I <sup>53,54</sup>. Sin embargo, una vacuna de ADN multigénica con gp63, KMP11, TRYP, LACK no protegió a los perros contra el reto parasitario experimental con *L. infantum*. Aunque la vacuna demostró ser segura y bien tolerada, no se detectaron respuestas inmunes celulares ni humorales dirigidas contra los antígenos completos de *Leishmania* después de la inmunización, y solo se detectaron anticuerpos específicos anti-LACK esporádicamente. Si bien se observó un retraso en la multiplicación de parásitos en los perros vacunados después del reto con *L. infantum*, la vacuna de ADN multiantigénica no pudo inducir protección contra la diseminación de la enfermedad parasitaria <sup>55</sup>.

La observación de que las vacunas de ADN pueden inducir respuestas tanto humorales como celulares en animales pequeños proporciona la esperanza de que pudieran convertirse en la vacuna de elección en el futuro para las infecciones que requieren inmunidad celular en humanos <sup>56,57</sup>. Sin embargo, la inducción de respuestas inmunes humorales y celulares después de la vacunación de humanos

con ADN ha sido menos prometedora en comparación con los modelos de roedores<sup>58-60</sup>. Esto ha llevado a intentar optimizar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN plasmídico y/o utilizar vacunas de ADN en combinación con otras vacunas o medicamentos para mejorar la inmunidad.

En términos de optimización de vacunas de ADN en humanos, se han adoptado varios enfoques para mejorar la inmunogenicidad. En este sentido, un enfoque se ha centrado en secuencias de nucleótidos específicas (motivos CpG) dentro del plásmido. Tanto en ratones como en seres humanos, se ha demostrado que los oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG estimulan múltiples tipos de células inmunitarias, lo que conduce a una mejora de las respuestas de linfocitos Th1 y T CD8<sup>+</sup>. Los ODN que contienen motivos CpG no metilados son capaces de activar directamente células que expresan el receptor tipo Toll 9, incluidos macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. En respuesta a este estímulo, las células procesan y presentan antígenos, regulan positivamente las moléculas coestimuladoras y secretan una variedad de citocinas proinflamatorias, incluida la IL-6, IL-12 y el factor de necrosis tumoral (TNF), promoviendo así la diferenciación de las células T vírgenes a células Th1. Cuando se utilizan como adyuvantes de vacunas, los ODN de CpG mejoran la función de las células presentadoras de antígenos profesionales y estimulan la generación de respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas de la vacuna. Adicionalmente, los estudios preclínicos indican que los ODN de CpG mejoran la actividad de las vacunas dirigidas a enfermedades infecciosas y cáncer. Los ensayos clínicos demuestran que los ODN de CpG tienen un buen perfil de seguridad y aumentan la inmunogenicidad de las vacunas coadministradas<sup>61-63</sup>.

La evidencia adicional de que la vacunación con ADN favorece una respuesta Th1 deriva de la observación de que el isotipo predominante de inmunoglobulina (Ig) detectado después de la vacunación con ADN en ratones es IgG2a<sup>64</sup>. Sin embargo, dependiendo del método de inmunización, las vacunas de ADN también pueden inducir respuestas Th2. Pertmer *et al.* (1996), demostraron por primera vez un



aumento de la producción de IL4 en ratones inmunizados en varias ocasiones con pistola de genes, mientras que la producción de IFN- $\gamma$  disminuyó simultáneamente. Además, se demostró que el isotipo predominante de Ig generado después de la inmunización repetida con pistola génica fue IgG1, mientras que el isotipo de Ig predominante generado después de la inmunización intramuscular fue IgG2a. Una posible explicación del por qué las respuestas de tipo Th2 son inducidas por pistola genética, es que la pistola suministra ADN plasmídico directamente en el interior de las células, evitando así la interacción superficial de motivos CpG, presentes en el plásmido, con las células presentadoras de antígeno (CPA) para mediar la liberación de citocinas por células Th1 <sup>65,66</sup>.

Otro método para optimizar la respuesta inmune de la vacunación es el uso de adyuvantes químicos. Actualmente, el adyuvante utilizado ampliamente en humanos es el alumbre, que mejora la producción de anticuerpos, pero tiene poco efecto sobre las respuestas de las células Th1 y T CD8<sup>+</sup>. Se ha demostrado que el adyuvante que consiste en QS21, monofosforil lípido A (MPL) y una emulsión de aceite en agua, SBAS2, genera tanto respuestas de anticuerpos fuertes como respuestas de tipo Th1 en combinación con un antígeno proteico en la malaria<sup>67</sup>. Esta vacuna 'RTS,S' ha demostrado eficacia protectora, pero relativamente corta, y actualmente se está sometiendo a ensayos de campo.

### **5.3.1 Seguridad de las vacunas de ADN**

Una de las principales preocupaciones de la vacunación con ADN plasmídico era que después de la inyección, el ADN se integraría en el genoma del hospedero receptor, aumentando así el riesgo de mutagénesis por inactivación de genes supresores de tumores o la activación de oncogenes. Por lo tanto, los estudios en humanos solo podrían iniciarse si esta preocupación se redujera en gran medida. Los estudios en animales que implican inyecciones de ADN plasmídico han demostrado que cualquier posible evento de integración sería poco frecuente y daría como resultado una tasa de mutación calculada mucho más baja que la tasa de mutación espontánea para los genomas de mamíferos <sup>68,69</sup>.

Una segunda preocupación fue que la inmunización con ADN plasmídico induciría anticuerpos anti-ADN y ésto aceleraría el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Los estudios en animales propensos a lupus no han mostrado aumentos significativos en los anticuerpos anti-ADN asociados al desarrollo de glomerulonefritis o enfermedad autoinmune, además, no hay evidencia de inducción o aceleración de enfermedades autoinmunes sistémicas después de la administración de inyecciones de ADN plasmídico <sup>70</sup>. Así mismo, en estudios clínicos de fase I de seguridad y tolerabilidad de una vacuna de ADN que codifica un antígeno de la malaria, voluntarios adultos sanos recibieron 3 inyecciones intramusculares de una de cuatro dosis diferentes del ADN plasmídico de la proteína del circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* (PfCSP) a intervalos mensuales, y durante los doce meses de seguimiento los voluntarios no mostraron eventos adversos o graves, cambios bioquímicos o hematológicos clínicamente significativos, ni anticuerpos anti-dsDNA <sup>58</sup>.

#### **5.4 Modelos animales**

El modelo de ratón y de perro son dos de los más utilizados para el estudio de la infección por *Leishmania* y su posible control farmacológico. Además de ellos, se han utilizado distintas especies de mono para probar diferentes vacunas, así como hámsteres y cobayos.

El modelo murino de la infección por *Leishmania* ha sido particularmente útil para la comprensión del papel que tiene la respuesta inmune del hospedero en la aparición y el mantenimiento de la susceptibilidad y la resistencia a la leishmaniasis. Así, la leishmaniasis cutánea provocada por la inoculación con *L. major* en ratón es uno de los modelos de infección crónica mejor caracterizados y fue la primera evidencia de la relevancia *in vivo* del balance Th1/Th2. El tipo de cepa de ratón determina el desarrollo de la infección: la cepa C57BL/6 se comporta uniformemente resistente, mientras que la BALB/c se muestra susceptible <sup>71,72</sup>.

Tras la infección de ratones C57BL/6, se observa una respuesta inmune temprana de tipo Th1, que básicamente produce una activación de macrófagos efectiva, mientras que la cepa susceptible BALB/c presenta una respuesta temprana de tipo

Th2 que resulta en el desarrollo de la enfermedad, la aparición de lesiones y la exacerbación a lo largo del tiempo. Aunque el modelo de ratón es un buen modelo de la LV para fases agudas y subagudas de la infección, no ocurre lo mismo para el estudio de la fase crónica de la enfermedad, ya que el establecimiento de ésta no llega a producirse <sup>72,73</sup>.

Mientras los ratones ofrecen un modelo genético bien caracterizado de resistencia y susceptibilidad, el modelo de hámster (*Mesocricetus auratus*) se muestra como un excelente modelo de susceptibilidad. Fue uno de los primeros modelos empleados para el estudio de la leishmaniasis debido a que presentaba importantes similitudes en las manifestaciones patológicas con la leishmaniasis humana y canina, con los signos de la enfermedad, siendo considerado adecuado para la caracterización de moléculas y mecanismos implicados en la patogénesis de la infección. Por ello, el hámster ha sido utilizado para estudios histopatológicos y para analizar la eficacia de drogas y vacunas contra la leishmaniasis visceral y cutánea <sup>73,74</sup>.

El perro es considerado un modelo más apropiado para estudiar los efectos potenciales de fármacos y vacunas contra la leishmaniasis visceral, ya que el patrón de la enfermedad en el perro es bastante similar a observado en los seres humanos, presentando un espectro de manifestaciones clínicas que van desde una infección autocontrolada a una enfermedad progresiva. Por otra parte, el perro es el principal reservorio de la leishmaniasis visceral zoonótica en la zona del mediterráneo y América Latina, debido a *L. infantum* y *L. chagasi*, respectivamente <sup>73,75</sup>.

## **5.5 Antígenos reversos**

Los avances computacionales y de bioinformática han mediado la transición del estudio de un solo gen (proteína) al estudio del genoma completo, permitiendo seleccionar proteínas de interés bajo los criterios que se consideren necesarios e importantes para desencadenar una respuesta inmune protectora frente a determinada enfermedad <sup>76</sup>. La vacunología reversa, comprende el análisis *in silico* del genoma para identificar los genes que codifican proteínas con características

asociadas a la inducción de inmunidad, y la evaluación sistemática de estas proteínas con respecto a su inmunogenicidad <sup>77</sup>.

Así, la selección y validación de antígenos reversos considera un abordaje inmunológico que comprende costo y eficiencia:

- Análisis de datos mediante algoritmos bioinformáticos.
- Métodos moleculares para la identificación de transcritos específicos del patógeno de interés.
- Predicción y determinación de los sitios de corte por el proteosoma.
- Predicción de péptidos con capacidad de unión a las moléculas del complejo MHC.
- Validación experimental, con ensayos *in vitro* e *in vivo* del potencial inmunogénico de los péptidos antigénicos seleccionados; selección de clonas de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno; ensayos funcionales de reconocimiento del patógeno, entre otros.

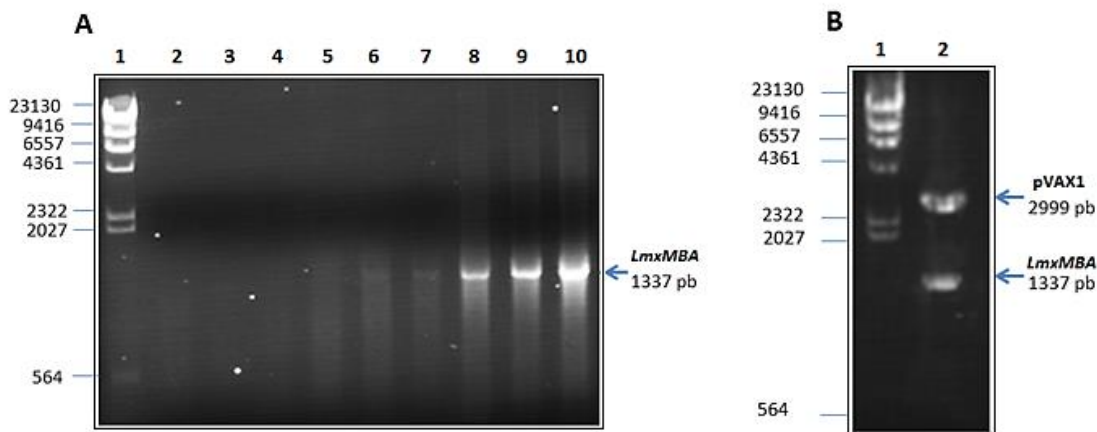
Empleando el enfoque de vacunología reversa, en el laboratorio se seleccionaron tres proteínas membranales para su posterior caracterización como antígenos vacunales: LmxEXR (receptor putativo), LmxMBA (fosfatasa ácida) y LmxHIP (proteína hipotética). En la tesis de maestría (2016)<sup>78</sup>, se seleccionó el gen que codifica a la proteína LmxMBA, con el fin de evaluar el efecto de la vacunación terapéutica de ratones BALB/c después de una infección experimental con *L. mexicana*.

## **6. ANTECEDENTES DIRECTOS**

Con la finalidad de encontrar un antígeno capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz contra la leishmaniasis, mediante análisis bioinformáticos, se seleccionó el antígeno LmxMBA y se evaluó si la vacunación con la proteína recombinante *LmxMBA* y el gen que la codifica, generaban un efecto terapéutico contra la infección por *L. mexicana* en un modelo murino <sup>78</sup>. La proteína *LmxMBA*, fue seleccionada mediante vacunología reversa, bajo los siguientes criterios: presencia de hélices transmembranales, localización subcelular en la membrana plasmática del parásito, presencia y cantidad de epítomos para linfocitos T

citotóxicos y linfocitos B. La proteína finalmente seleccionada, *LmxMBA*, correspondió a una fosfatasa ácida de membrana plasmática de promastigotes de *L. mexicana*.

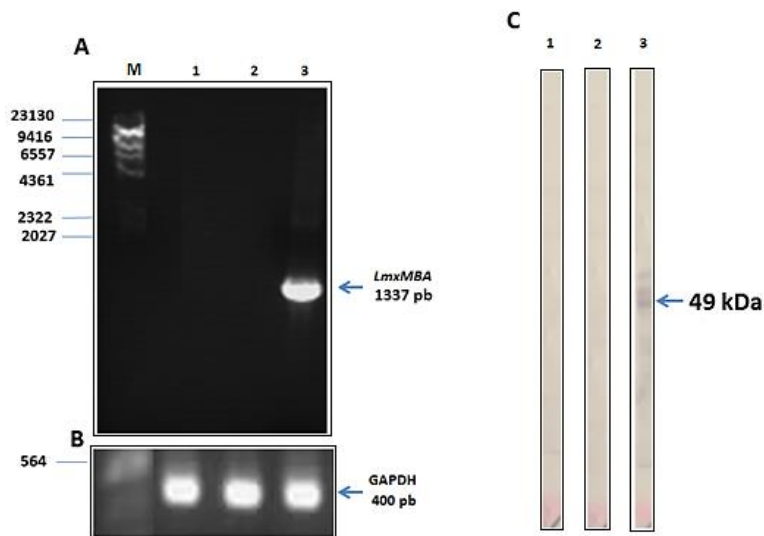
A partir de la región extramembranal de la proteína *LmxMBA* se diseñaron oligonucleótidos específicos y se amplificó el gen que la codifica a partir del ADN genómico de *L. mexicana*. El producto amplificado fue clonado en el vector pCR4-TOPO y posteriormente subclonado en el vector de expresión en células eucariotas pVAX1 (Figura 2). Se realizó la secuenciación del plásmido generado, pVAX1::*LmxMBA*, para comprobar la correcta orientación y marco de lectura del inserto dentro del vector.



**Figura 2.** Subclonación del fragmento *LmxMBA* en el vector pVAX1. (A) PCR a partir de las colonias transformadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. Carriles 2-10, productos de PCR. (B) Análisis por restricción de la construcción pVAX1::*LmxMBA*. Carril 2, liberación del inserto clonado con HindIII/EcoRI. Para A y B, el carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular  $\lambda$  Hind III.

Para comprobar si el gen *LmxMBA* era capaz de expresarse en células eucarióticas, se llevaron a cabo ensayos de transfección de células HeLa con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. Las células HeLa se recolectaron 48 h postransfección y se extrajo el ARN, a partir del cual se obtuvo el ADNc. El ADNc se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos anteriormente mencionados. Los productos amplificados se analizaron en un gel al 1% de agarosa (Figura 3A). Como control

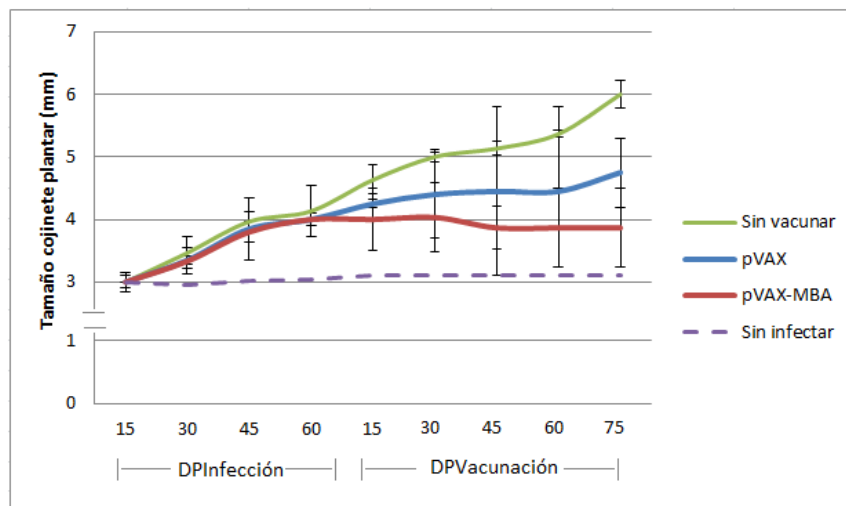
se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban el gen GAPDH, de expresión constitutiva, con un tamaño esperado de 400 pb (Figura 3B). Además, se observó la expresión de la porción extramembranal de la proteína *LmxMBA* (49 kDa) por inmunotransferencia en extractos celulares de células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*.



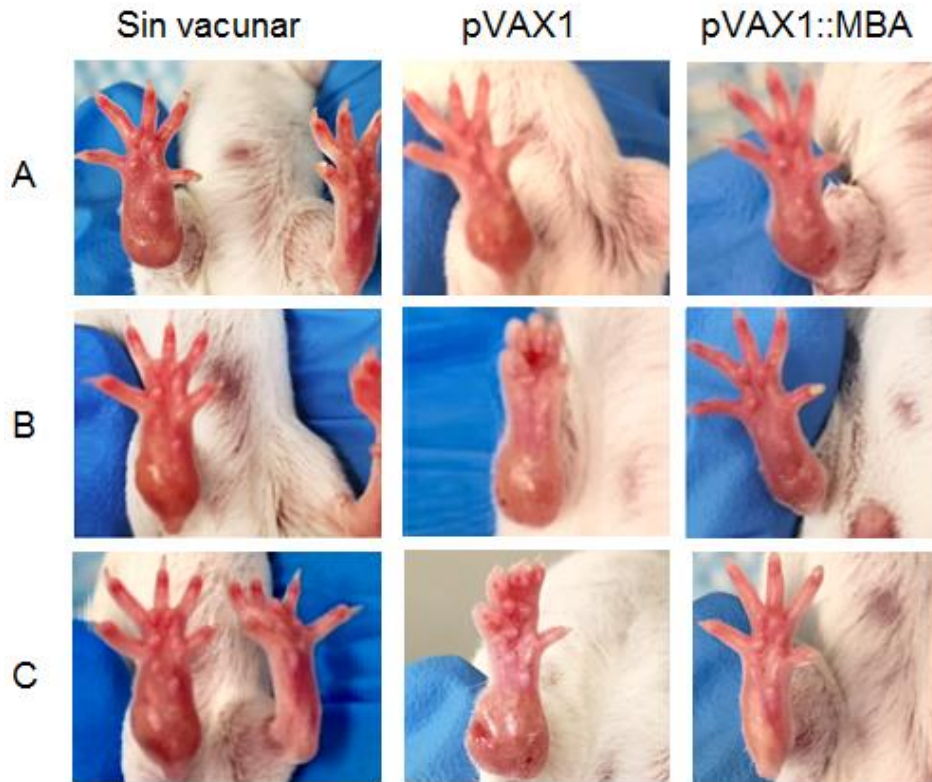
**Figura 3.** RT-PCR e inmunotransferencia de la proteína *LmxMBA* expresada en células HeLa transfectadas con el plásmido pVAX1::*LmxMBA*. (A) RT-PCR y (B) expresión constitutiva del GAPDH. (C) Inmunotransferencia, anticuerpo primario: anti-*LmxMBA*. (1) Células HeLa sin transfectar. (2) Células HeLa transfectadas con pVAX1. (3) Células HeLa transfectadas con pVAX1::*LmxMBA*.

Finalmente, para evaluar el efecto terapéutico de la vacunación con ADN o proteína, ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar con  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* y dos meses después de la infección los ratones fueron vacunados con el plásmido o con la proteína recombinante. El proceso de infección se evaluó mediante la medición del tamaño del cojinete plantar (mm) y la evolución de la enfermedad con y sin vacunación terapéutica.

En la figura 4, se puede observar la tendencia para los diferentes grupos de ratones. El grupo sin vacunar presentó un aumento progresivo del tamaño del cojinete plantar desde el día 15 posinfección hasta el último día de la medición (135 días posinfección); no así en los ratones vacunados con el vector vacío, pVAX1, o con el plásmido pVAX1::LmxMBA. En el grupo de ratones vacunado con pVAX1 se observó menor aumento en el tamaño del cojinete plantar en comparación con el grupo de ratones sin vacunar. En contraste, el tamaño del cojinete plantar del grupo de ratones vacunados con pVAX1::LmxMBA se mantuvo estable hasta el día 30 posvacunación, después del cual se observó una ligera disminución que se conservó hasta el día 75 posvacunación. En la figura 5, se observa el desarrollo macroscópico de la lesión después de 15, 45 y 75 días posvacunación con ADN.



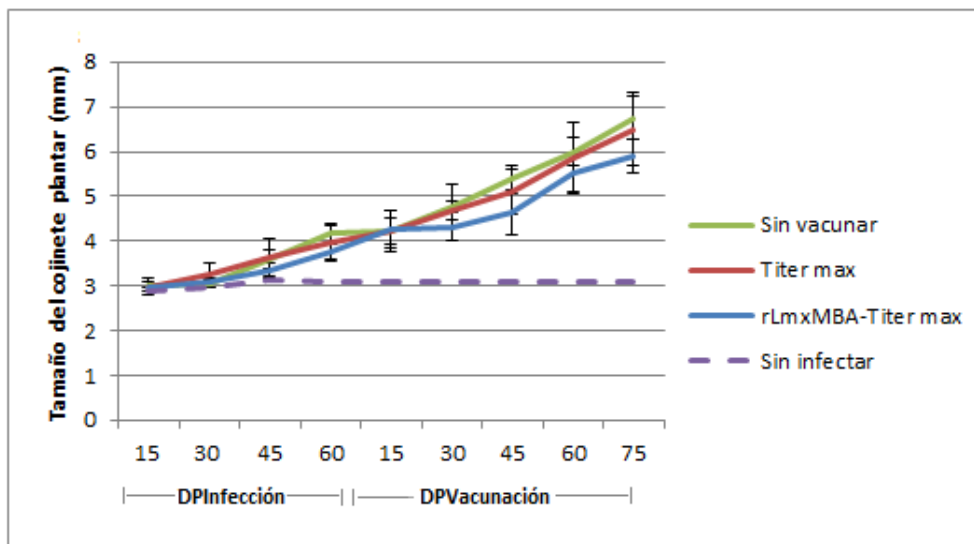
**Figura 4.** Efecto terapéutico de la vacuna de ADN en ratones infectados con *L. mexicana*. Ratones BALB/c inoculados en el cojinete plantar derecho con  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* y vacunados 60 días posinfección: Grupo 1, con el plásmido pVAX1::LmxMBA (línea roja); Grupo 2, con el vector pVAX1 (línea azul); Grupo 3, sin vacunar (línea verde). Se realizó el seguimiento de la lesión mediante la medición del tamaño del cojinete plantar.



**Figura 5.** Desarrollo macroscópico de la lesión después de la vacunación con ADN. Cojinete plantar de ratones infectados con promastigotes de *L. mexicana* y posteriormente vacunados. 15 días (A), 45 días (B) y 75 días (C) después de la primera dosis de vacunación con ADN.

En cuanto a la vacunación con la proteína recombinante (Figura 6), tanto los ratones vacunados con adyuvante TiterMax (Sigma, St. Louis, MO, USA) como los ratones sin vacunar presentaron el mismo aumento de tamaño del cojinete plantar. De igual manera, los ratones vacunados con la proteína *rLmxMBA* desarrollaron una inflamación macroscópica similar a la del cojinete plantar de los grupos control.





**Figura 6.** Efecto terapéutico de la vacuna con la proteína *rLmxMBA* en ratones infectados con *L. mexicana*. Ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar derecho con  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* y 60 días posinfección se vacunaron: Grupo 1, con la proteína *rLmxMBA/TiterMax*; Grupo 2, con *TiterMax*; Grupo 3, sin vacunar. Se realizó seguimiento de la lesión mediante la medición del tamaño del cojinete plantar.

Al comparar el efecto terapéutico generado por los dos tipos de vacunación, se evidenció mejor control de la infección en los ratones vacunados con ADN, ya que después de la primera vacunación no hubo aumento en el tamaño de la lesión, a diferencia de los ratones vacunados con la proteína, en los que el tamaño del cojinete plantar siguió aumentando hasta el último día evaluado (día 75 posvacunación).

Esta evidencia experimental sugiere que la vacunación terapéutica con el gen que codifica para la porción extramembranal del antígeno candidato *LmxMBA* favorece el control de leishmaniasis cutánea localizada en el modelo de ratón. Sin embargo, resulta conveniente usar estrategias que favorezcan la optimización de la vacuna y potencien la respuesta inmune contra el parásito, con el propósito de disminuir las dosis del antígeno y tiempo de curación/recuperación de la enfermedad.

## 7. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de amplia distribución geográfica, afecta a 98 países a nivel mundial, más de 12 millones de personas están infectados y 350 millones están en riesgo de adquirir la infección. A la fecha se han caracterizado varias moléculas del parásito que inducen respuestas inmunitarias contra la infección por *Leishmania*; sin embargo, aún no se cuenta con una vacuna contra la leishmaniasis humana. La observación de que las vacunas de ADN pueden inducir respuestas tanto humorales como celulares en animales proporciona la esperanza de que pudieran convertirse en la vacuna de elección en el futuro para las infecciones que requieren inmunidad celular en humanos.

Basados en los resultados previamente obtenidos por la vacunación terapéutica con ADN que codifica para el antígeno candidato LmxMBA, es necesario evaluar el tipo de respuesta inmune que está favoreciendo la disminución del tamaño del cojinete plantar, así como prolongar el tiempo de monitoreo de los animales posvacunación, con el fin de observar diferencias significativas en el control de la infección o remisión de la enfermedad.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto macroscópico y la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación con ADN que codifica para el antígeno LmxMBA de *L. mexicana* en un modelo murino de leishmaniasis cutánea localizada.

### **8.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la localización de la proteína LmxMBA en amastigotes y promastigotes de *L. mexicana*.
2. Evaluar la protección inducida por la vacunación profiláctica con el plásmido pVAX1::LmxMBA en un modelo murino de leishmaniasis cutánea localizada.
3. Determinar el efecto y respuesta inmune inducida por la vacunación terapéutica con el plásmido pVAX1::LmxMBA en el modelo de leishmaniasis de hámster y ratón.

## 9. MATERIALES Y METODOS

### 9.1 Material biológico

**Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento:** Se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen™) para clonación del gen en el vector pVAX1. Las cepas bacterianas se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB), suplementado con kanamicina (40  $\mu$ g/mL).

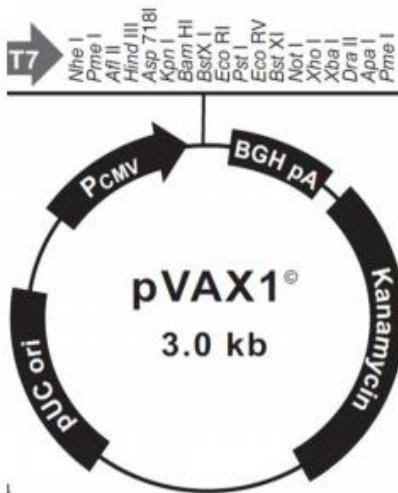
### Plásmidos

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Características	Origen
pVAX1	Plásmido diseñado para su uso en el desarrollo de vacunas de ADN (Figura 9).	Invitrogen
pVAX1::LmxMBA	Derivado de pVAX1 que contiene el gen codificante para la LmxMBA de <i>L. mexicana</i> .	Burgos Reyes. Tesis de maestría. 2016
pRSETA	Plásmido que contiene una bandera de histidinas para fusionar y obtener proteínas recombinantes. Inducible con IPTG	Invitrogen
pRSETA::LmxMBA	Derivado de pRSETA que contiene el gen codificante para la proteína recombinante LmxMBA de <i>L. mexicana</i> .	Burgos Reyes. Tesis de maestría. 2016

El vector pVAX1™ está construido con base en el documento de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), "Puntos a considerar sobre las vacunas de ADN plasmídico para las indicaciones de enfermedades infecciosas preventivas". Las características del vector permiten la replicación de un número elevado de copias en *E. coli* y una expresión de la proteína de interés en las células de mamíferos. El vector pVAX1, tiene las siguientes características:

- Secuencias de ADN eucariotas limitadas a las necesarias para la expresión, a fin de minimizar la posibilidad de integración cromosómica.
- Gen de resistencia a la kanamicina para la selección en *E. coli* porque se ha informado que la ampicilina causa una respuesta alérgica en algunas personas.



**Figura 9. Mapa del plásmido pVAX1.** El plásmido posee un sitio promotor de citomegalovirus (PCMV), un origen de replicación pUC, una región génica codificante de resistencia a la kanamicina, un sitio de poliadenilación conferido por la secuencia proveniente de la hormona de crecimiento bovina (BGH pA), además de un sitio de clonación múltiple.

**Parásitos:** *L. mexicana* cepa MHOM/MX/92/UADY68 se utilizó para los experimentos. Esta cepa fue aislada en Campeche, a partir de lesiones de un paciente mexicano con cuadro clínico de leishmaniasis cutánea localizada (REF).

**Cultivo de parásitos:** Los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron axénicamente a 28 °C en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio RPMI-1640 (GIBCO), pH 7.4, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (100 U/ mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina). Cada 4-5 días se renovaron los cultivos dependiendo del crecimiento del parásito.

**Animales de laboratorio:** Se utilizaron ratones BALB/c hembra (4-6 semanas de edad) y hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) (6-8 semanas de edad) obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN (México), siguiendo las especificaciones de la Norma Nacional Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que es una versión de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011. Todo protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal del CINVESTAV (CINVESTAV-IACUC).

## 9.2 Microscopía de inmunofluorescencia

Los amastigotes y promastigotes de *L. mexicana* recuperados de cultivo se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS filtrado, pH 7.4 durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Después de un lavado adicional con PBS, las células se resuspendieron en PBS filtrado y luego se dejaron sedimentar y adherir a la superficie de los portaobjetos de vidrio durante 30 min a TA. Las células fijadas se permeabilizaron con metanol frío durante 5 min y luego se marcaron con anti-LmxMBA policlonal de ratón diluido 1:50 en PBS. Se usó un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC para la detección fluorescente de la proteína LmxMBA. Los portaobjetos se montaron con Vectashield y DAPI (4', 6'-diamino-2-fenilindol).

## 9.3 Microscopía inmunoelectrónica

Los amastigotes y promastigotes de *L. mexicana* recuperados de cultivo se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en glutaraldehído 2% en cacodilato 0.1 M durante 1 h a TA. Las muestras se incrustaron en LR White y se polimerizaron bajo UV a 4 °C durante la noche. Los cortes se montaron en una rejilla de níquel cubierta de formvar y posteriormente se incubaron con suero anti-LmxMBA. Se utilizó un anticuerpo

secundario de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con partículas de oro de 10 nm (dilución 1:40). El inmunomarcaje se realizó a temperatura ambiente. Se observaron cortes finos con un microscopio electrónico de transmisión Morgani 268 D Philips (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos).

#### **9.4 Purificación de ADN plasmídico**

Las células *E. coli* DH5 $\alpha$  se transformaron con los plásmidos para vacunación con ADN, anteriormente mencionados. Las células fueron espatuladas en placas LB con kanamicina (40  $\mu$ g/mL), y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Se realizó PCR a partir de las colonias obtenidas. Las reacciones que amplificaron el fragmento deseado se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %. Posteriormente se realizó la purificación de ADN plasmídico libre de endotoxinas mediante cromatografía de intercambio aniónico usando el kit de purificación de ADN plasmídico PureLink™ HiPure (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se inoculó una de las colonias positivas en 50 mL de medio LB con kanamicina, y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación constante. El cultivo bacteriano se centrifugó durante 20 min a 4.000 x *g* (Beckman Coulter J6-HC); la pastilla se resuspendió en 15 mL de STE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa 50 mM), posteriormente se adicionaron 30 mL de la solución II (NaOH 2 N y SDS 1% preparada al momento), se mezcló la muestra por inversión e incubó en hielo 30 min. Se adicionó 1.5 mL de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión e incubó en hielo otros 30 min, la solución se centrifugó a 12.000 x *g* (Beckman Coulter J6-HC) por 10 min para separar el *debris* y el ADN cromosomal, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó un volumen igual de isopropanol (1:1), se mezcló por inversión y se dejó precipitando durante toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 12.000 x *g* (Beckman Coulter J6-HC) durante 30 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó con 500  $\mu$ L de ARNasa AT1 a 37 °C durante 2 h. La columna de purificación se equilibró con 10 mL del tampón de equilibrio (EQ1) y se dejó que la solución se drenara por gravedad. El sobrenadante anterior incubado con ARNasa se cargó en la columna equilibrada y se dejó que la solución de la columna se drenara por gravedad. La columna se lavó dos veces con 30 mL de tampón de lavado (W8) y se procedió a

eluir el ADN con 15 mL del tampón de elución (E4). Se precipitó el ADN agregando 7.5 mL de isopropanol al tubo de elución, se mezcló bien y se centrifugó el tubo a 12.000 x *g* durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró con cuidado y se desechó. El sedimento se resuspendió en 6 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12.000 x *g* durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró con cuidado y se desechó. La pastilla se dejó secar al aire durante 10 min y se resuspendió en 250 µL de PBS estéril pH 7.4.

Después de la purificación, se determinó la concentración de plásmido mediante absorbancia a 260 nm y 280 nm. Las proporciones de DO 260/280 para el ADN purificado fueron de 1.8 a 2.0, lo que indicó que las preparaciones estaban libres de contaminación proteica importante. El ADN plasmídico obtenido, se analizó por restricción enzimática utilizando las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (*New England Biolabs*) para liberar el gen *LmxMBA* clonado en el vector pVAX1. Para verificar la restricción enzimática se visualizó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador de luz u.v.

**Reacción de secuenciación:** Se utilizaron tubos de PCR estériles donde se colocaron 1000-5000 ng de ADN plasmídico, 8 µL de MIX y 10 pmol de oligonucleótido T7 para una reacción y el oligonucleótido T3 para la otra, se llevó a 20 µL con agua estéril. Se sometió al programa: 96 °C por 30 seg, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 20 s, 53 °C durante 20 s y 60 °C por 4 min. Posteriormente se hidrataron columnas para purificación, se colocaron las muestras y se centrifugaron a 1.500 x *g* (Microcentrífuga *Eppendorf* 5415C) durante 2 min, en ellas se colocaron 20 µL de la reacción de PCR, las columnas se centrifugaron a 1.500 x *g* (Microcentrífuga *Eppendorf* 5415C) por 2 min, se colectó y secó la muestra en “*speed vac*”. Se guardaron a -20 °C y se secuenciaron de forma automatizada utilizando el kit *Taq Fluorescence-Based Dye Terminator Cycle Sequencing*. Las lecturas de la reacción de secuenciación se obtuvieron con el equipo *Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E In DNA Sequencer*, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-México a cargo de la QFB. María Guadalupe Aguilar González.



## **9.5 Infección de animales con promastigotes de *L. mexicana* y esquemas de vacunación**

### **Vacunación profiláctica y reto parasitario con promastigotes de *L. mexicana***

Diez ratones hembra BALB/c se dividieron en 3 grupos. Grupo I, ratones inmunizados con PBS; grupo II, ratones inmunizados con el plásmido pVAX1 vacío; grupo III, ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Cada ratón se inmunizó con 3 dosis de 100 µg del plásmido correspondiente por vía intramuscular, con intervalos de 15 días entre cada dosis. Transcurridas 3 semanas después de la última inmunización los animales se infectaron en el cojinete plantar trasero derecho por vía intradérmica con  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* resuspendidos en PBS. El tamaño de la lesión se determinó semanalmente midiendo el espesor de las almohadillas plantar infectada y de la sana, usando un calibrador *Vernier* automático y se calculó la diferencia de tamaño entre las almohadillas de las patas. Los animales se sometieron a la eutanasia 105 días después de la infección, se obtuvieron sueros inmunes por punción cardíaca y se amputaron las patas traseras a nivel de la articulación subtalar para la obtención de tejido cutáneo del cojinete plantar. Los bazos y las muestras de suero se recolectaron con fines inmunológicos.

### **Infección de ratones BALB/c con *L. mexicana* y vacunación terapéutica con el plásmido pVAX1::LmxMBA**

Diez ratones hembra BALB/c se inocularon en el cojinete plantar con  $5 \times 10^6$  promastigotes resuspendidos en PBS estéril y se dio seguimiento al desarrollo de la lesión, como se mencionó anteriormente. Trascurridos 30 días después de la infección, cuando la lesión era evidente a nivel macroscópico en todos los animales, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos y se vacunaron con PBS, pVAX1 o pVAX1::LmxMBA siguiendo el esquema de vacunación anterior. La evolución de la lesión se monitoreó para determinar el establecimiento de las manifestaciones físicas y el tamaño de inflamación durante 105 días posinfección.

## **Infección de hámsteres con *L. mexicana* y vacunación terapéutica con el plásmido pVAX1::LmxMBA**

Doce animales se inocularon por vía intradérmica en el cojinete plantar de la pata trasera derecha con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana*. Se dio seguimiento al tamaño de la lesión y 30 días después de la infección se inició el esquema de vacunación terapéutica. La vacunación consistió en tres dosis de 200 µg del plásmido pVAX-LmxMBA/hámster. La dosis se administró por vía intramuscular, a nivel del bíceps femoral, con intervalos de 15 días. El tamaño de la lesión se determinó semanalmente midiendo el espesor de la almohadilla plantar infectada y sana, usando un calibrador vernier, y se calculó la diferencia de tamaño entre las almohadillas de las dos patas. Los animales se sometieron a la eutanasia 105 días después de la infección, se obtuvieron los sueros inmunes por punción cardíaca y se amputaron las patas traseras a nivel de la articulación subtalar para la obtención de tejido cutáneo del cojinete plantar.

### **9.6 Determinación de la carga parasitaria**

El número de parásitos en las lesiones se cuantificó mediante ensayos de dilución limitante <sup>74</sup>. Brevemente, se les aplicó la eutanasia a los ratones y se extrajeron asépticamente las patas infectadas y control, se amputaron al nivel de la articulación subtalar y se limpiaron con alcohol ionizado al 3% para descontaminar. Se pesó individualmente y se tomó la diferencia entre la pata infectada y sana como el peso neto de la lesión. Luego se hicieron cortes de piel de la almohadilla plantar (aproximadamente 20 mg) y se homogenizaron en tubo Eppendorf con 1 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (medio que contenía SFB inactivado por calor al 10%, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomicina), y se diluyó con el mismo medio a una concentración final de 1 mg/mL. Después, el material se diluyó diez veces en forma seriada en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, y se colocó en placas de fondo plano de 96 pocillos, por duplicado. Las placas se incubaron a 26°C y se observaron bajo un microscopio invertido (*Nikon diaphot*, Nikon, Japón), 4 días después se registró la presencia de promastigotes móviles en cada pocillo y se cuantificó la concentración de parásitos por miligramo

de tejido como el recíproco de la dilución más alta que fue positiva para los parásitos. Cada resultado positivo se expresó en el gráfico como el número log<sub>10</sub> de promastigotes.

### **9.7 Ensayo de proliferación celular**

Los esplenocitos de ratón se prepararon de la siguiente manera <sup>79</sup>.

Se tomaron los bazos de ratones inmunizados/retados en condiciones estériles, se diseccionaron y se resuspendieron en PBS frío y estéril (pH 7.4) que contenía SFB al 2%. Los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis RBC y las suspensiones de células individuales se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células /mL con RPMI 1640 (*HyClone, Logan, UT*) que contenía SFB al 10%. Las suspensiones de células diluidas (100 µL/pocillo) se dispensaron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (*Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY*) y se estimularon con 10 µg/mL de la proteína LmxMBA recombinante. Se utilizó concanavalina A (2 µg/mL), pocillos sin estímulo y medio de cultivo completo como controles positivos, negativos y blanco, respectivamente. Cada muestra de esplenocitos se sembró en placas por triplicado. La respuesta proliferativa se midió mediante WST-1 (*Roche Diagnostics, Mannheim, DE*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas de cultivo, se añadieron 10 µL de WST-1 a cada pocillo y se continuó la incubación durante 4 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, se leyeron las placas a 450 nm. El índice de estimulación (SI) se calculó como la relación entre el valor de DO promedio de los pocillos que contienen células estimuladas con antígeno y la DO promedio de los pocillos que contienen sólo células con el medio.

### **9.8 Análisis histológico**

Los cortes extraídos de la piel de la planta de la pata se fijaron con formaldehído al 10% durante 24 horas. Los cortes de piel fijados se incluyeron en parafina, se cortaron (6 µm) y se tiñeron con hematoxilina-eosina para la observación morfológica. Se observó microscópicamente la morfología de la piel ante la aparición de alteraciones histopatológicas (presencia de infiltraciones inflamatorias y alteraciones estructurales). Estas alteraciones y la presencia de amastigotes en

macrófagos se examinaron con microscopio óptico (*Nikon Eclipse 80i*, Nikon, Japón). Se examinaron al menos 100 campos microscópicos antes de que se reportara una muestra como negativa.

### **9.9 Determinación de isotipo de inmunoglobulinas**

Las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, e IgM de los ratones vacunados con ADN se evaluaron mediante ensayos de ELISA indirecto. Las placas se cubrieron con extracto total de promastigotes (5 µg/mL) o con rLmxMBA (2 µg/mL) en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6 y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron con PBS 0.05%-Tween 20 (PBS-T), se bloquearon con PBS-leche descremada al 5% por 2 h a 37°C, se lavaron nuevamente con PBS-T. Después de lavar, se agregaron las muestras de suero diluidas (1: 100) en PBST, se incubaron a 37 ° C durante 1 hora y se lavaron 3 veces después de la reacción. Como control negativo, se usaron los sueros preinmunes en todos los experimentos. Para la isotipificación, las placas se incubaron con anticuerpos de cabra antiisotipo de ratón marcados con peroxidasa (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:10000 en PBS-T durante 2 h a TA y luego se lavaron 4 veces con PBST y PBS. La actividad peroxidasa se desarrolló mediante la adición del sustrato de ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de microplacas ELISA (*LabSystem Multiskan MS*).

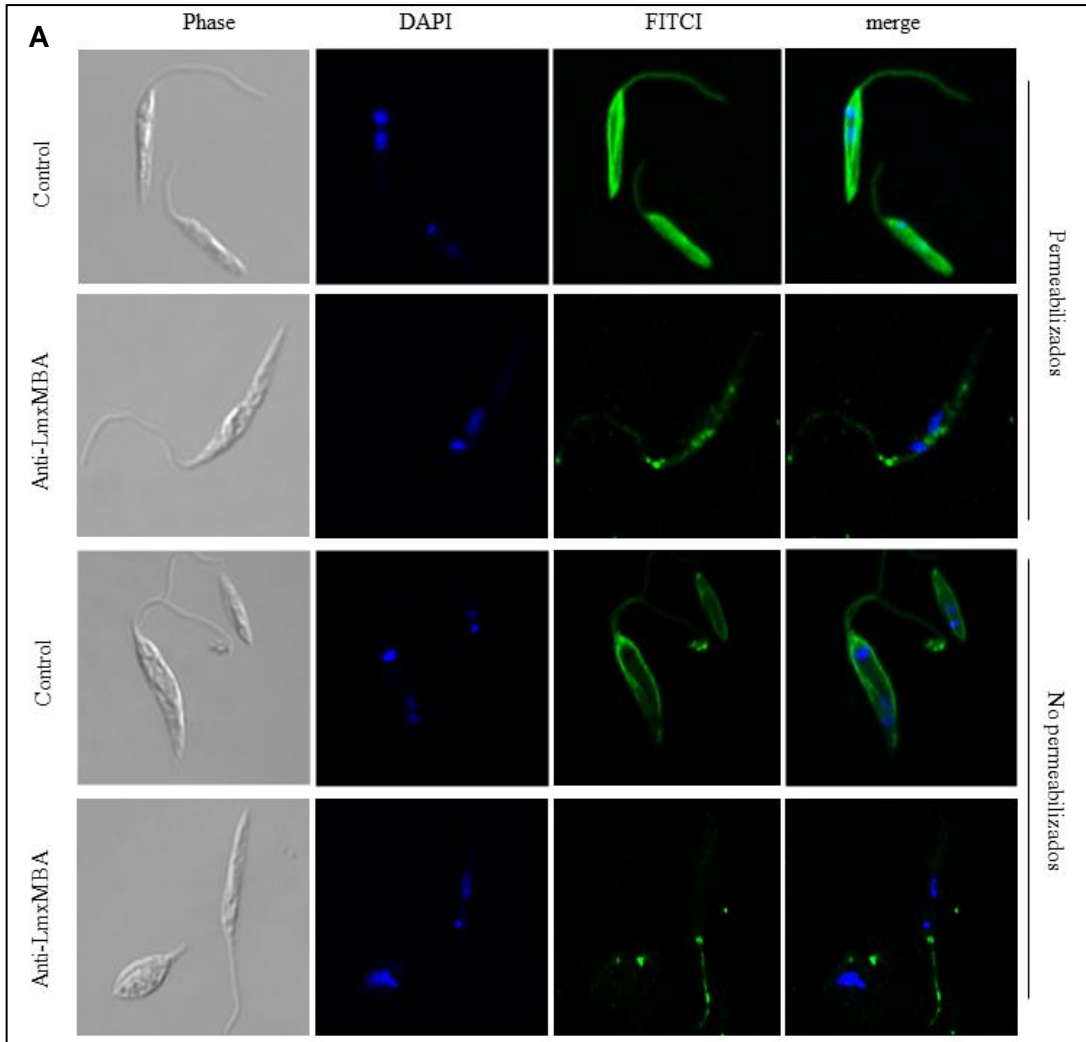
### **9.10 Análisis estadístico**

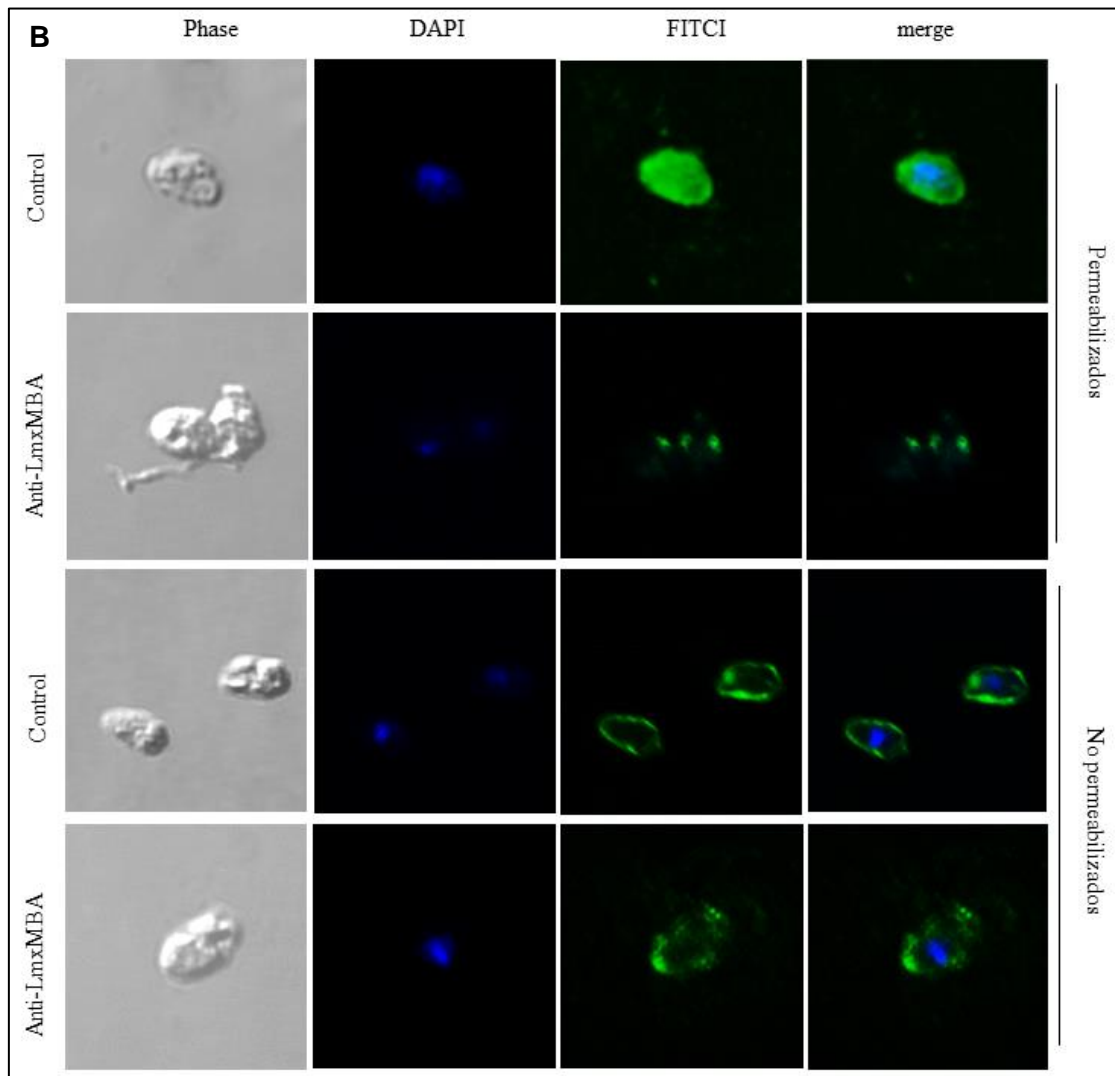
Los resultados se expresan como medias  $\pm$  los errores estándar de la media (SEM). Todos los datos del estudio se compararon usando el paquete estadístico para el editor de datos SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Tukey para identificar grupos significativamente diferentes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p era  $<0.05$ .

## 10. RESULTADOS

### **Localización subcelular de la proteína LmxMBA en amastigotes y promastigotes de *L. mexicana***

Se utilizaron promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* para observar la localización subcelular de la proteína LmxMBA mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células permeabilizadas y no permeabilizadas se incubaron con el suero anti-LmxMBA, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde). Se utilizó DAPI para teñir el ADN tanto nuclear como mitocondrial. Como se muestra en la figura 6A, la fluorescencia verde se asoció al extremo anterior del parásito, cercana a la base del flagelo en promastigotes permeabilizados y no permeabilizados. En los parásitos permeabilizados también se observó fluorescencia verde entre el núcleo y el cinetoplasto. En amastigotes, figura 6B, la fluorescencia verde se asoció principalmente al extremo anterior de la membrana del parásito. El control negativo con el suero preinmune fue negativo para estructuras parasitarias, las cuales estaban prácticamente libres del marcaje mostrando solo unas pocas partículas aisladas encontradas dispersas en los cortes estudiados (datos no mostrados).





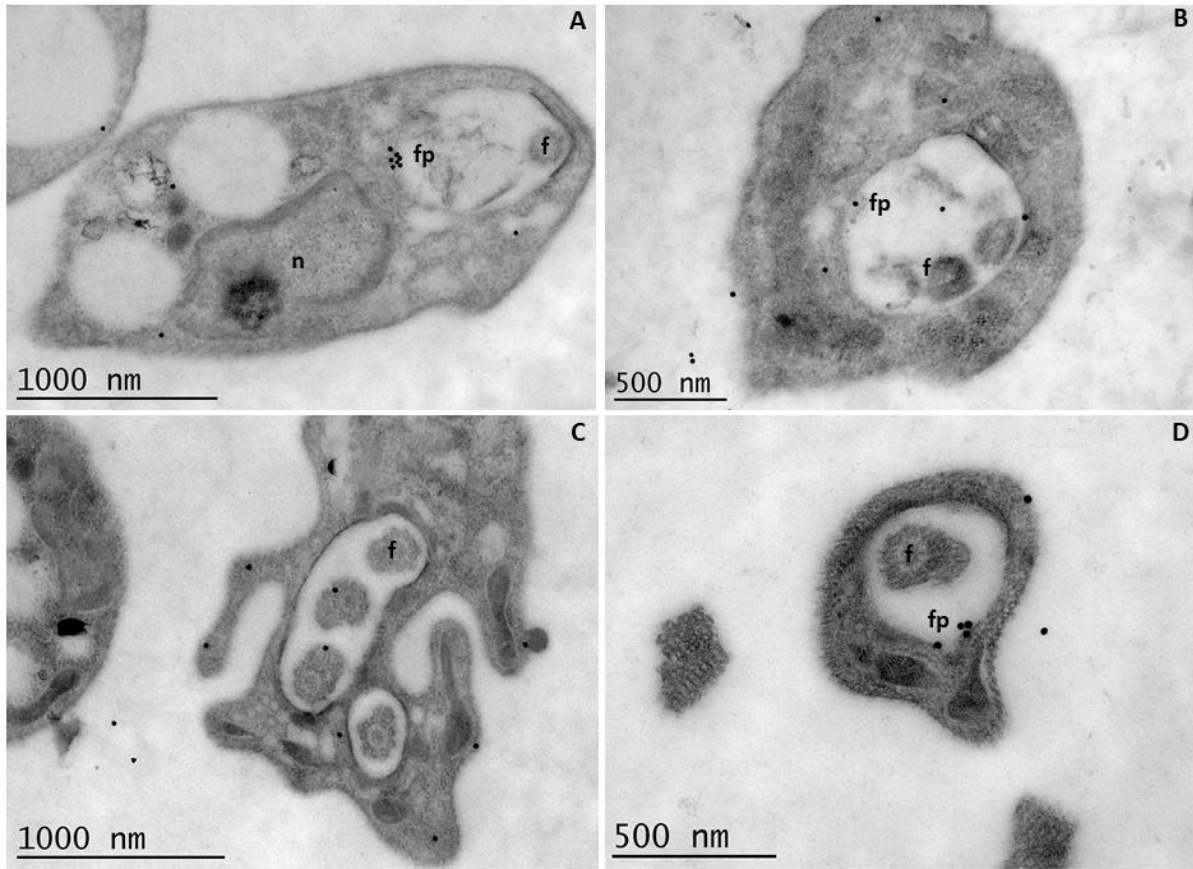
**Figura 6.** Localización subcelular de la proteína LmxMBA en promastigotes (A) y amastigotes (B) de *L. mexicana*. Microscopía de inmunofluorescencia utilizando suero anti-LmxMBA y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. El núcleo y el kinetoplasto se marcaron con DAPI. El control representa la integridad de la membrana del parásito y la tinción con suero anti-leishmania.

Para corroborar la localización de la proteína LmxMBA en los diferentes estadios de *L. mexicana* se realizó microscopía inmunoelectrónica. En la localización ultraestructural de LmxMBA (Figura 7) se obtuvo un patrón similar al observado en

las imágenes de inmunofluorescencias Se evidenció un inmunomarcaje en la membrana del bolsillo flagelar o cercano a éste, tanto en promastigotes como en amastigotes de *L. mexicana*. También se detectó un cierto marcaje en el flagelo o en la membrana del parásito. Otras estructuras y orgánulos de los amastigotes, como núcleos y mitocondrias, no se marcaron, lo que indica la especificidad del anticuerpo y la ubicación de LmxMBA.

En *Trypanosoma brucei*, la fosfatasa ácida unida a membrana 1 (TbMBAP1) se localiza en endosomas de reciclaje positivos para RAB11 y vesículas exocíticas, sugiriendo que debería incorporarse fácilmente en el bolsillo flagelar. Sin embargo, la concentración de TbMBAP1 en la membrana del bolsillo flagelar, así como en las vesículas recubiertas y no recubiertas de clatrina de clase I, es muy baja. Una sobreexpresión de tres a cuatro veces lleva a la aparición de TbMBAP1 en la membrana del bolsillo flagelar y cuando se sobreexpresa en niveles más altos, TbMBAP1 se dirige específicamente al flagelo. Similar a *L. mexicana*<sup>80</sup>, cuando se eleva el nivel de expresión de la fosfatasa ácida de *T. brucei*, la enzima se extiende por toda la membrana plasmática, sugiriendo que bajo ciertas condiciones de la infección natural en las que la proteína se sobreexpresa, ésta podría translocarse a la superficie celular del parásito y de esta manera estar más accesible como posible blanco de vacuna para el desarrollo de antígenos candidatos.





**Figura 7.** Distribución de LmxMBA en amastigotes (A, B) y promastigotes (C, D) de *L. mexicana* por microscopía inmunoeléctrica. Los parásitos se fijaron con glutaraldehído 0.1% y se incubaron con suero anti-LmxMBA, seguido del marcaje con inmunoro (partículas de oro de 10 nm). fp, bolsillo flagelar; f, flagelo; n, núcleo.

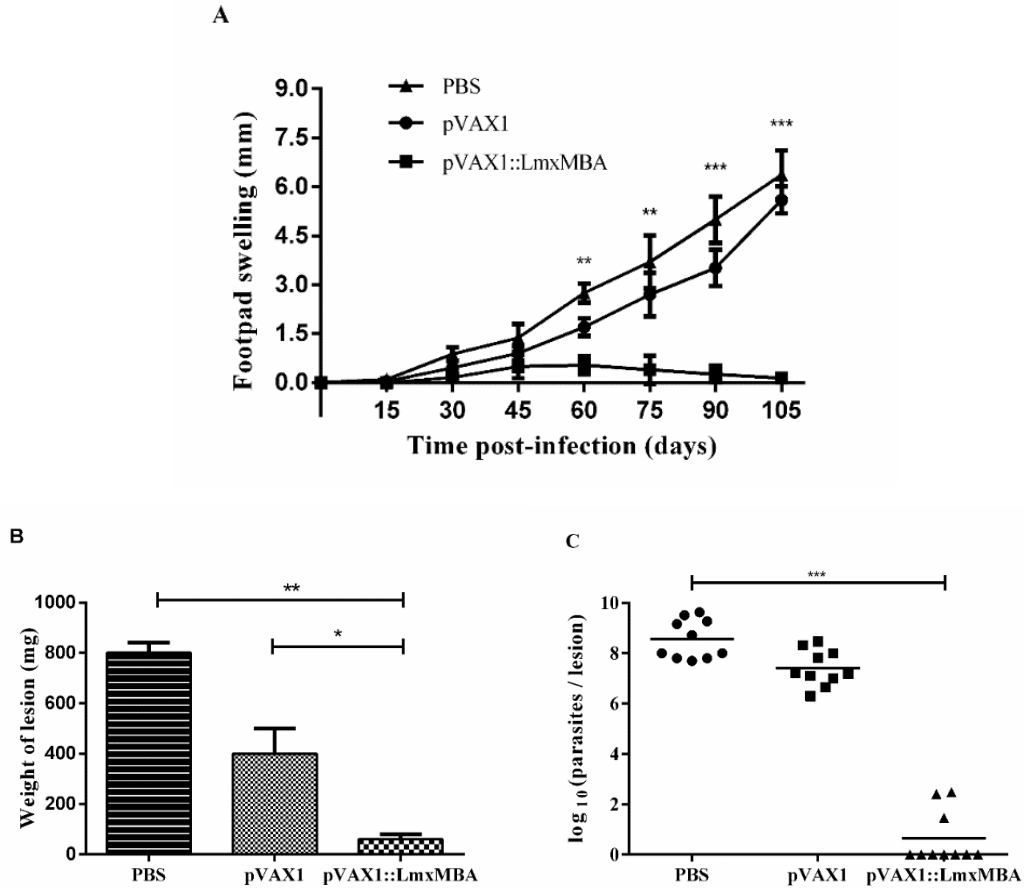
## **VACUNACIÓN PROFILÁCTICA**

### **Efecto de la vacunación con el plásmido pVAX1::LmxMBA sobre el desarrollo de la lesión**

El desarrollo de la lesión se monitoreó semanalmente y la cinética del tamaño de la lesión mostró que la infección con *L. mexicana* causó un aumento progresivo en el tamaño de la almohadilla plantar en todos los ratones de los grupos control. Los ratones inmunizados con el plásmido que codifica el gen LmxMBA mostraron un aumento retardado y transitorio del diámetro de la lesión en comparación con los ratones control, inmunizados con PBS o con pVAX1 ( $p < 0.01$ ) (Figura 8A). Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de la lesión desde el día 60 hasta el día 105 después de la infección en comparación con el grupo inmunizado con PBS y con pVAX1 ( $p < 0.001$ ). La vacunación de ratones con el plásmido vacío pVAX1 mostró en estos animales un crecimiento continuo de la lesión, similar al observado en ratones inmunizados con PBS ( $p > 0.05$ ).

### **Determinación de la carga parasitaria**

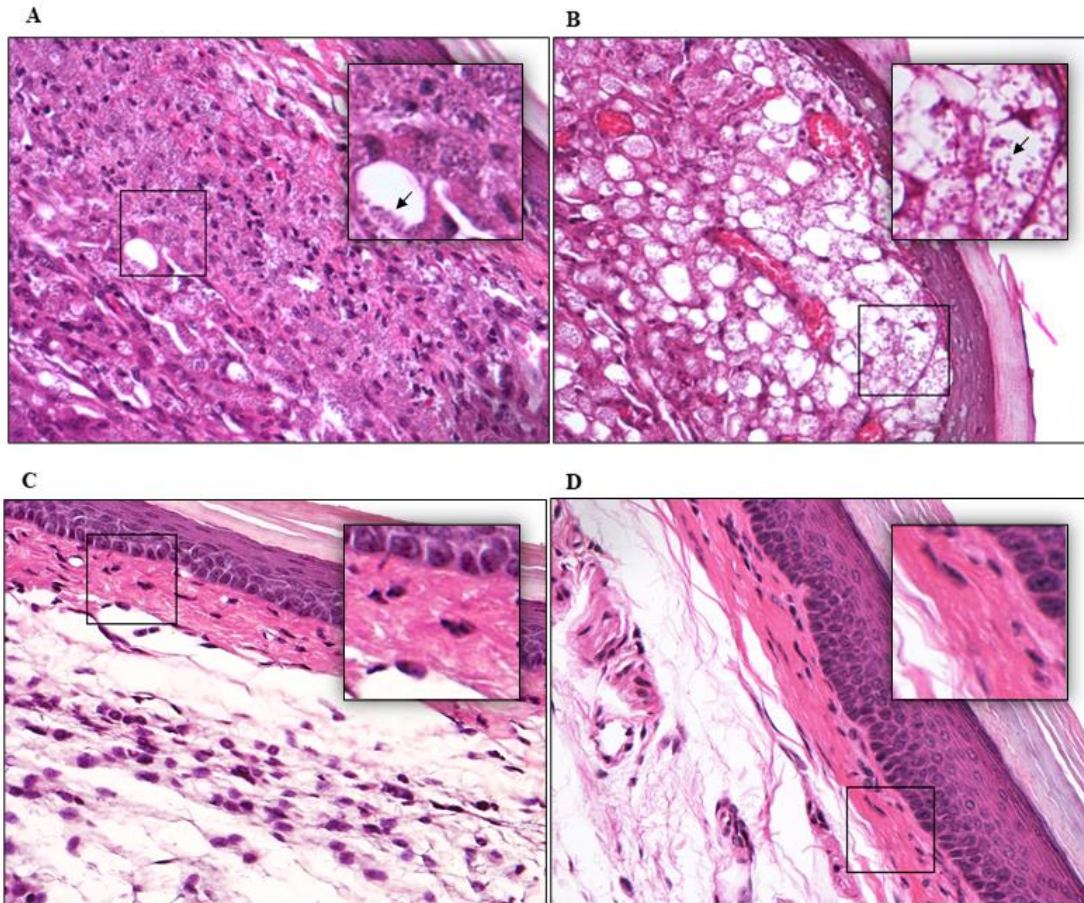
Hubo una correlación entre el tamaño de las lesiones y la carga parasitaria de los diferentes grupos evaluados (Figuras 8A y 8C). A los 105 días posinfección, las lesiones de los ratones inmunizados con el plásmido recombinante presentaron menor peso en comparación con el control inmunizado con pVAX1 y con PBS ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 8B). También se observó una cantidad significativamente menor de parásitos en las lesiones plantares de los ratones vacunados con el plásmido pVAX1::LmxMBA, en comparación con los grupos de control inmunizados con el vector vacío o PBS ( $p < 0.001$ ) (Figura 8C). Cabe resaltar que solo el 30% de los animales del grupo experimental presentaron parásitos en la pata infectada, a diferencia de los grupos controles donde la carga parasitaria fue evidente en el 100% de los ratones infectados.



**Figura 8.** Inflamación de la pata (A), peso de la lesión (B) y carga de parásitos (C) en ratones BALB/c inmunizados y retados con promastigotes de *L. mexicana*. Los ratones se inmunizaron tres veces (intervalo de 15 días entre cada dosis) con pVAX1::LmxMBA o el vector vacío, pVAX1 y la inflamación macroscópica de la almohadilla plantar se midió semanalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  los errores estándar de la media (SEM) de diez ratones por grupo (A). El peso de la lesión se determinó mediante la amputación de la pata 105 días después de la infección, una vez que los animales se sacrificaron; la diferencia en el peso entre la pata infectada y la sana se tomó como el peso neto de la lesión (B). Se determinó el número de parásitos en la almohadilla de la pata por el método de dilución limitante, los resultados se expresan como Log<sub>10</sub>. (C). \*p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\*p <0.001.

## Estudio histopatológico

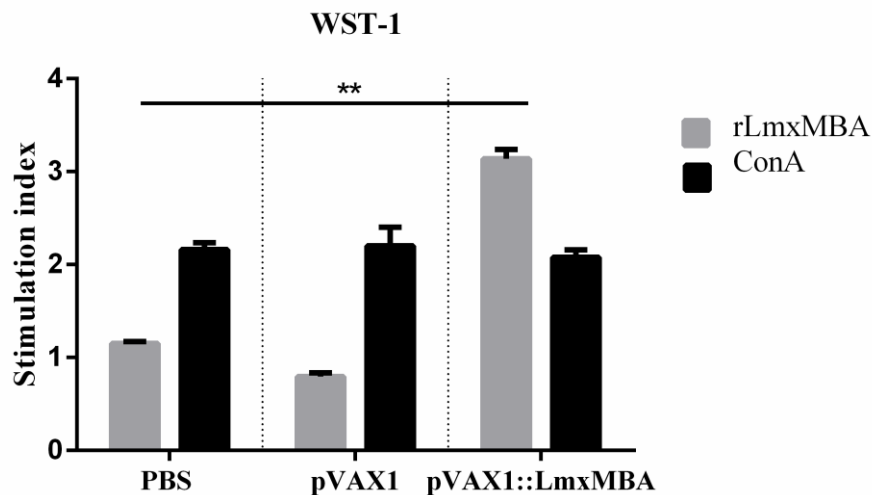
El estudio histopatológico mostró una menor cantidad de parásitos en la piel de los ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Los ratones inmunizados con PBS o con el plásmido vacío y posteriormente retados con *L. mexicana*, presentaron un elevado número de amastigotes (> 200 por campo) en el sitio de infección y mostraron un intenso infiltrado inflamatorio, abundante en polimorfonucleares y mononucleares que ocupaban la dermis superficial y profunda, con la presencia de múltiples células vacuoladas multiparasitadas en 100% de los animales de los grupos control (Figura 9A, 9B). Por otro lado, los ratones inmunizados con el plásmido pVAX1::LmxMBA presentaron una menor cantidad de estructuras parasitarias por macrófago en el sitio de la lesión o ausencia total de ellas mediante examen microscópico (Figura 9C). El 80% de los animales dieron negativo en el examen microscópico de amastigotes y el 20% restante mostró pocos parásitos (0-20 por campo) en la dermis. La vacunación profiláctica con pVAX1::LmxMBA mantuvo las características histológicas de la piel aun después del reto parasitario, y se observó una dermis ocupada con abundantes fibras de colágeno, similar al tejido de animales sin infectar (Figura 9D). Aunque aún existía un infiltrado inflamatorio leve en la dermis de algunos animales (30%) (incluidos aquellos con un número bajo de parásitos por campo), no se observó la pérdida de la microarquitectura tisular.



**Figura 9.** Análisis histopatológico de la almohadilla plantar de ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA y retados con promastigotes de *L. mexicana*. Los tejidos se colectaron 105 días después de la infección y los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los macrófagos vacuolados que contienen amastigotes fueron abundantes en las lesiones de la almohadilla plantar de los ratones inmunizados con PBS (A), así como en los ratones inmunizados con el vector vacío, pVAX1 (B), la dermis de los animales de control mostró una infiltración masiva con macrófagos parasitados (flechas). Por el contrario, los ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA mostraron una epidermis más conservada con linfocitos y macrófagos que contenían pocos o ningún parásito (C). La microarquitectura de la dermis en ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA se conservó globalmente de forma similar al control de la pata sana (D). (600x) (recuadro, aumento, 1000x).

## Proliferación celular

Se estudió la respuesta inmune celular generada por la inmunización con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Para ello, se evaluó la capacidad linfoproliferativa de esplenocitos de ratones inmunizados al ser reestimulados con la proteína recombinante, rLmxMBA. Como se muestra en la figura 10, los esplenocitos de los animales inmunizados con el plásmido que codifica la proteína LmxMBA tuvieron mayor proliferación específica en respuesta al antígeno recombinante en contraste con los grupos control ( $p < 0.01$ ). Los valores de los índices de estimulación en respuesta al antígeno rLmxMBA fueron 3 veces más altos en comparación con los esplenocitos de los animales inmunizados con el plásmido vacío o con PBS. Esto demostró la capacidad de LmxMBA para inducir la proliferación de esplenocitos como inductor de respuestas inmunes celulares. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos pVAX1 y PBS ( $p > 0.05$ ).



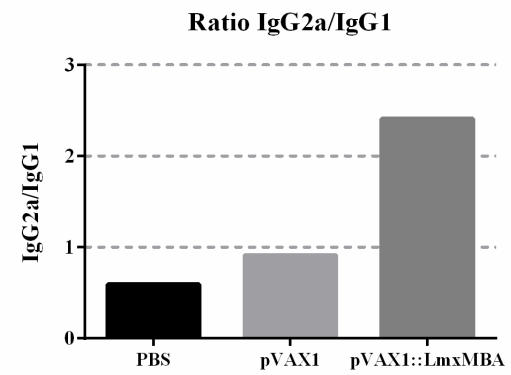
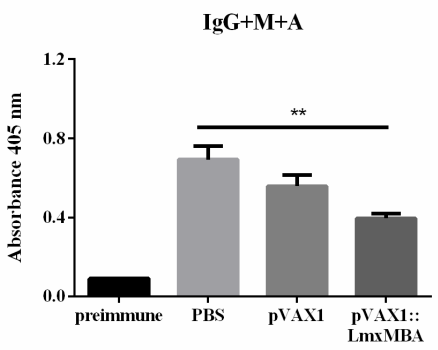
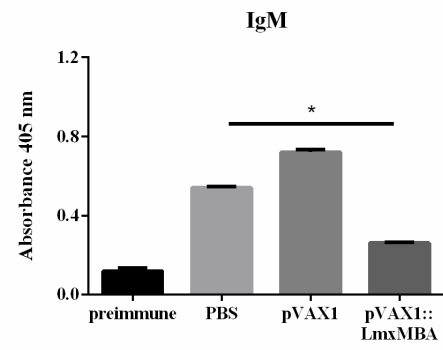
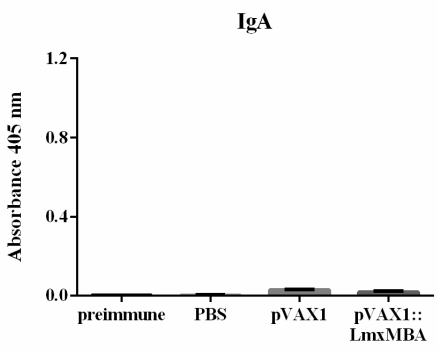
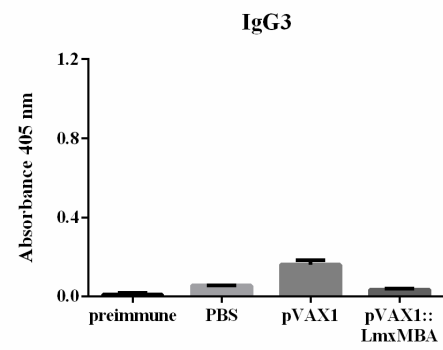
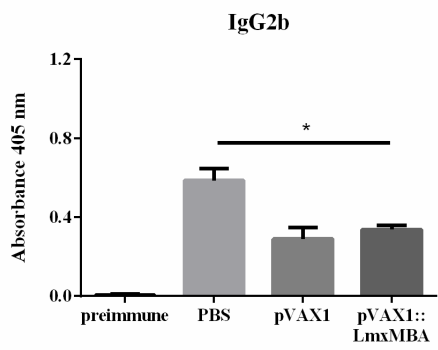
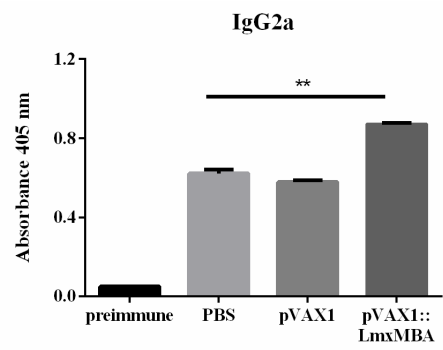
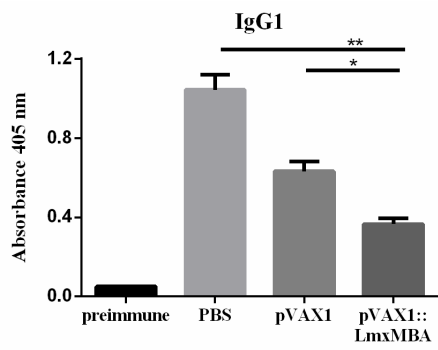
**Figura 10.** Proliferación de células mononucleares en el bazo de ratones inmunizados con PBS, pVAX1 o pVAX1::LmxMBA después de la estimulación con rLmxMBA. El índice de estimulación medio (SI) de los ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA fue 3 veces mayor que el SI medio de los grupos control. ConA, Concanavalina A. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Resultados expresados como promedio de triplicados y se representa un experimento representativo.

## Isotipo de anticuerpos

Para caracterizar la respuesta inmune humoral generada por la inmunización con el plásmido pVAX1::LmxMBA, se determinaron los isotipos de anticuerpos específicos de antígeno. Las muestras de suero de los ratones previamente inmunizados fueron colectadas 105 días después del reto parasitario y se analizaron para determinar el isotipo de anticuerpos anti-LmxMBA mediante ELISA indirecto.

La inmunización de ratones BALB/c con el plásmido pVAX1::LmxMBA posteriormente retados con promastigotes de *L. mexicana* generó predominantemente anticuerpos IgG2a anti-LmxMBA, mientras que la inmunización con pVAX1 y PBS produjo principalmente anticuerpos IgG1 anti-LmxMBA (Figura 11). Los tres tipos de inmunizaciones generaron niveles marginales o indetectables de otros isotipos de anticuerpos, incluidos IgG3 e IgA. La inmunización con ADN con el plásmido candidato produjo proporciones de IgG2a/IgG1 >1 (2.4), lo que indicó más IgG2a que IgG1. Las inmunizaciones de los grupos control dieron como resultado proporciones de IgG2a/IgG1 <1 (0.7), lo que significa más IgG1 que IgG2a. En general, los ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA presentaron 2 veces más anticuerpos IgG2a que IgG1 anti-LmxMBA. Esta relación no difirió significativamente entre ratones inmunizados con PBS o pVAX1. Los valores de IgG + M + A anti-LmxMBA fueron significativamente más bajos en el grupo inmunizado con pVAX1::LmxMBA que los grupos de control.

Antes del reto parasitario, los sueros de los ratones inmunizados también fueron colectados y el isotipo de anticuerpos anti-LmxMBA se determinó 2 semanas después de la última inmunización. Antes del reto parasitario, todos los ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA mostraron sus proporciones de IgG1 a IgG2a similares a las proporciones posteriores al desafío. Los grupos control no mostraron niveles detectables de los diferentes isotipos de anticuerpos (datos no mostrados).





**Figura 11.** Respuestas serológicas específicas de la vacunación profiláctica. Las muestras de suero se recolectaron por punción cardíaca el día 105 posinfección. Las placas se recubrieron con 2 µg/mL de rLmxMBA y las muestras de suero se diluyeron 1/100. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar de las densidades ópticas. \* p <0.05, \*\* p <0.01.

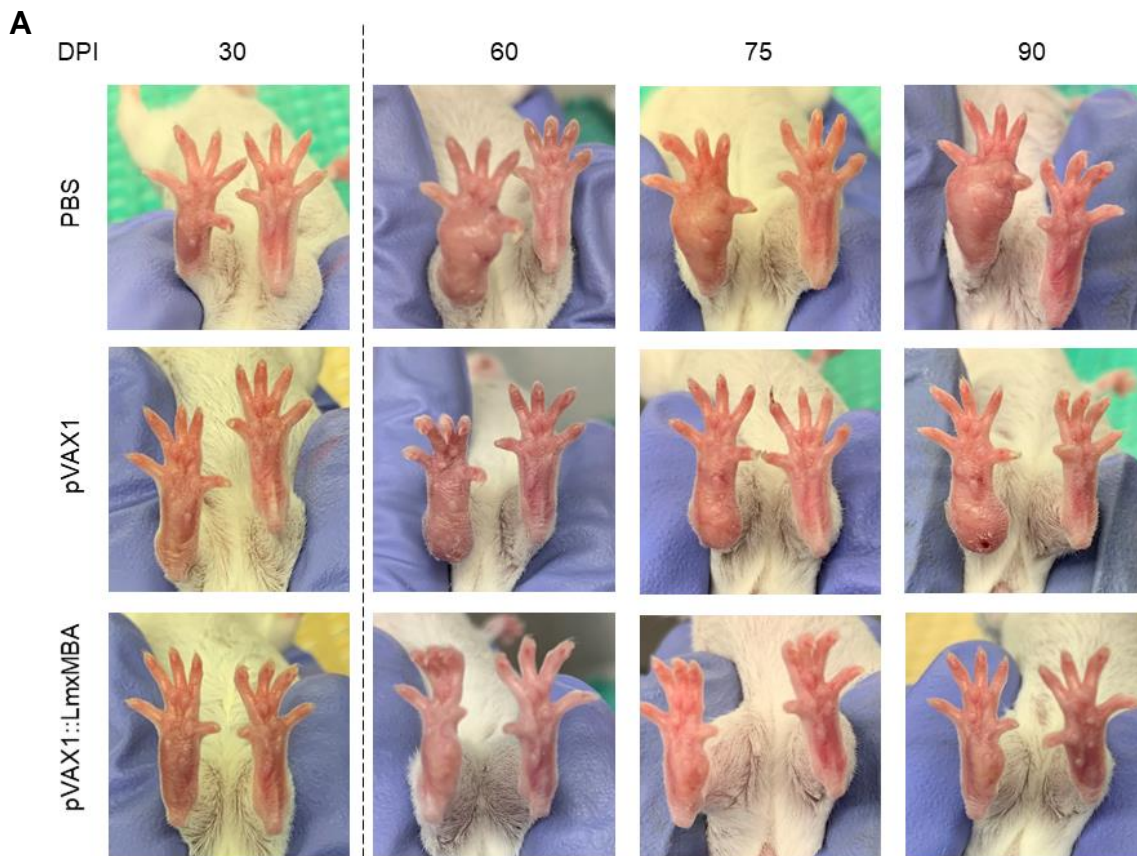
## VACUNACION TERAPÉUTICA

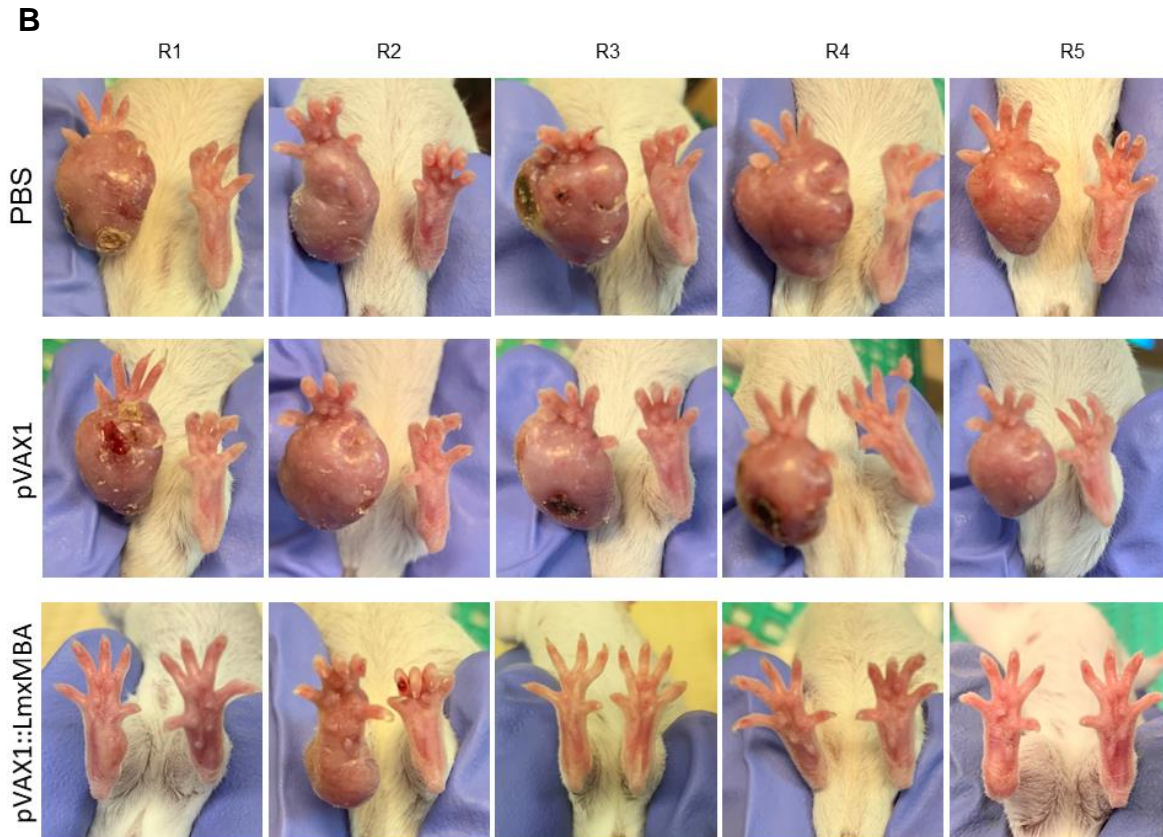
La vacunación terapéutica se realizó en animales previamente infectados con promastigotes de *L. mexicana* y el efecto de la vacunación se evaluó midiendo el tamaño de la lesión en la almohadilla plantar, la carga parasitaria y analizando la lesión a nivel histopatológico en los dos modelos animales, el ratón y el hámster. Debido a la ausencia de anticuerpos antihámster, el isotipo de anticuerpos se determinó solo en el modelo de ratón.

### **Efecto de la vacunación terapéutica con plásmido pVAX1::LmxMBA sobre la infección por *Leishmania mexicana* en los modelos de hámster y ratón**

La inoculación de promastigotes de *L. mexicana* provocó un aumento progresivo en el tamaño de la almohadilla plantar de todos los animales hasta el día 30 posinfección (Figura 12A). Los hámsteres y ratones mostraron lesiones laterales similares sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre grupos (comparando grupos de hámster vs grupos de hámster y grupos de ratón vs grupos de ratón). Los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos por modelo animal y se realizó la vacunación 30 días posinfección cuando las lesiones de los animales eran evidentes y mostraban un aumento de al menos 0.5 cm en promedio por grupo. Al evaluar el efecto macroscópico de la vacunación con el plásmido pVAX1::LmxMBA, se observó un retraso en la progresión de la inflamación local de la almohadilla plantar de los dos modelos animales que fue significativa desde el día 75 posvacunación hasta el último día evaluado (Figura 13). En el modelo de hámster, 45 días después de la administración de la última dosis, la vacunación terapéutica indujo la reducción total (remisión clínica) del tamaño de la

lesión en el 75% del grupo experimental y el 25% restante mejoró satisfactoriamente, mostrando un tamaño de lesión menor al tamaño inicial, antes de empezar el esquema de vacunación. En el grupo de ratones, la vacunación con el gen candidato indujo una reducción total de las lesiones en el 70% del grupo experimental, mejoría clínica en el 20% y tuvo menor efecto en el 10% (inflamación moderada). Además, ninguno de los animales vacunados con el plásmido candidato presentó signos clínicos tardíos de la enfermedad, lesiones ulceradas con o sin tejido necrótico en el cojinete plantar infectado, a diferencia de los grupos control que presentaron ulceración en 90% de los animales. La vacunación terapéutica con el plásmido vacío, pVAX1, no afectó el tamaño de las lesiones ya que los animales de este grupo presentaron un desarrollo de las lesiones, similar en tamaño y ulceración, al del grupo de animales a los que se les administró la vacunación terapéutica con PBS (Figura 12B).





**Figura 12.** Efecto macroscópico de la vacunación terapéutica con el plásmido recombinante en ratones infectados con promastigotes de *L. mexicana*. Evolución de la lesión (imagen representativa de 1 animal por grupo) (A) y un día previo a la aplicación de la eutanasia (imágenes de 5 animales por grupo) (B). R=ratón.

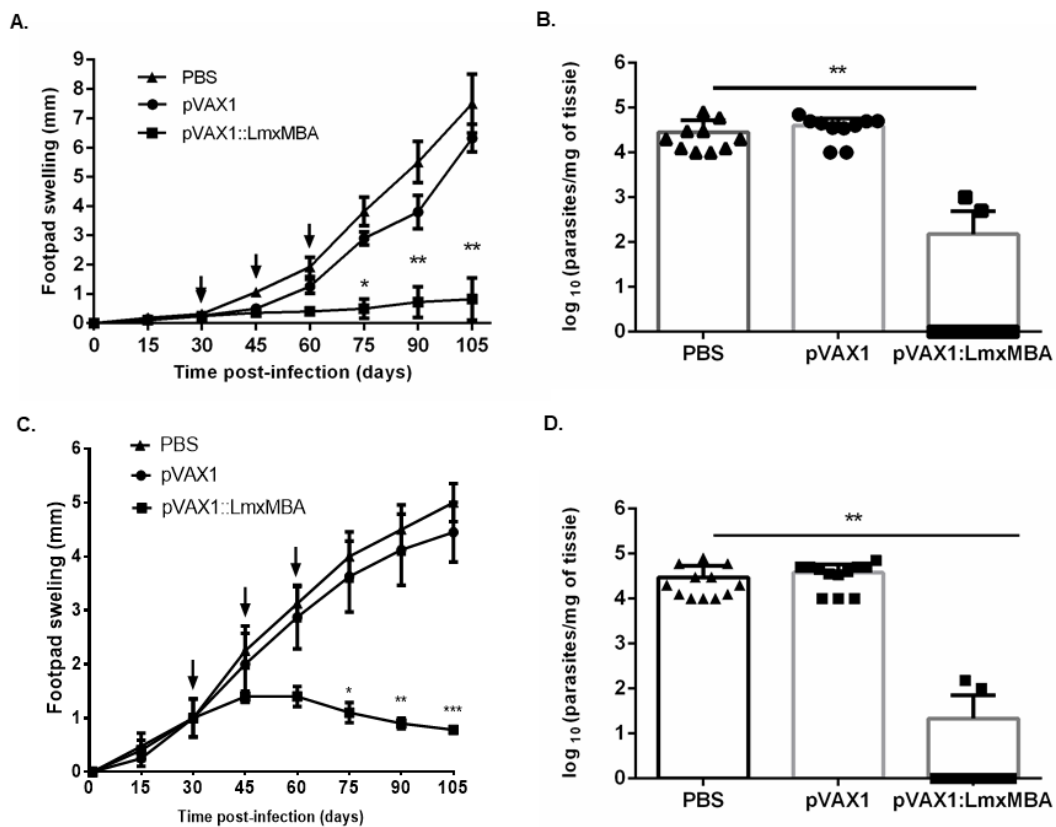
Los resultados clínicos obtenidos con el modelo del hámster resultaron muy similares a los obtenidos con el modelo de ratón (datos no mostrados).

### **Determinación de la carga parasitaria**

Además de reducir la severidad de las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea en los dos modelos animales, la vacunación con el plásmido pVAX1::LmxMBA de hámsteres y ratones previamente infectados con

promastigotes de *L. mexicana*, también generó una menor carga parasitaria en el tejido infectado en comparación con los grupos control (Figura 13B, 13D).

La carga parasitaria al día 105 posinfección fue significativamente menor en el cojinete plantar de los animales vacunados con el plásmido pVAX1::LmxMBA, en comparación con los grupos control vacunados con pVAX1 o PBS ( $p < 0.01$ ) (Figura 13B, 13D). Cabe resaltar que solo 17% de los hámsteres y 20% de los ratones de los grupos vacunados con el gen candidato presentaron parásitos viables en la pata infectada, a diferencia de los grupos controles donde la presencia de parásitos viables fue evidente en todos los animales.

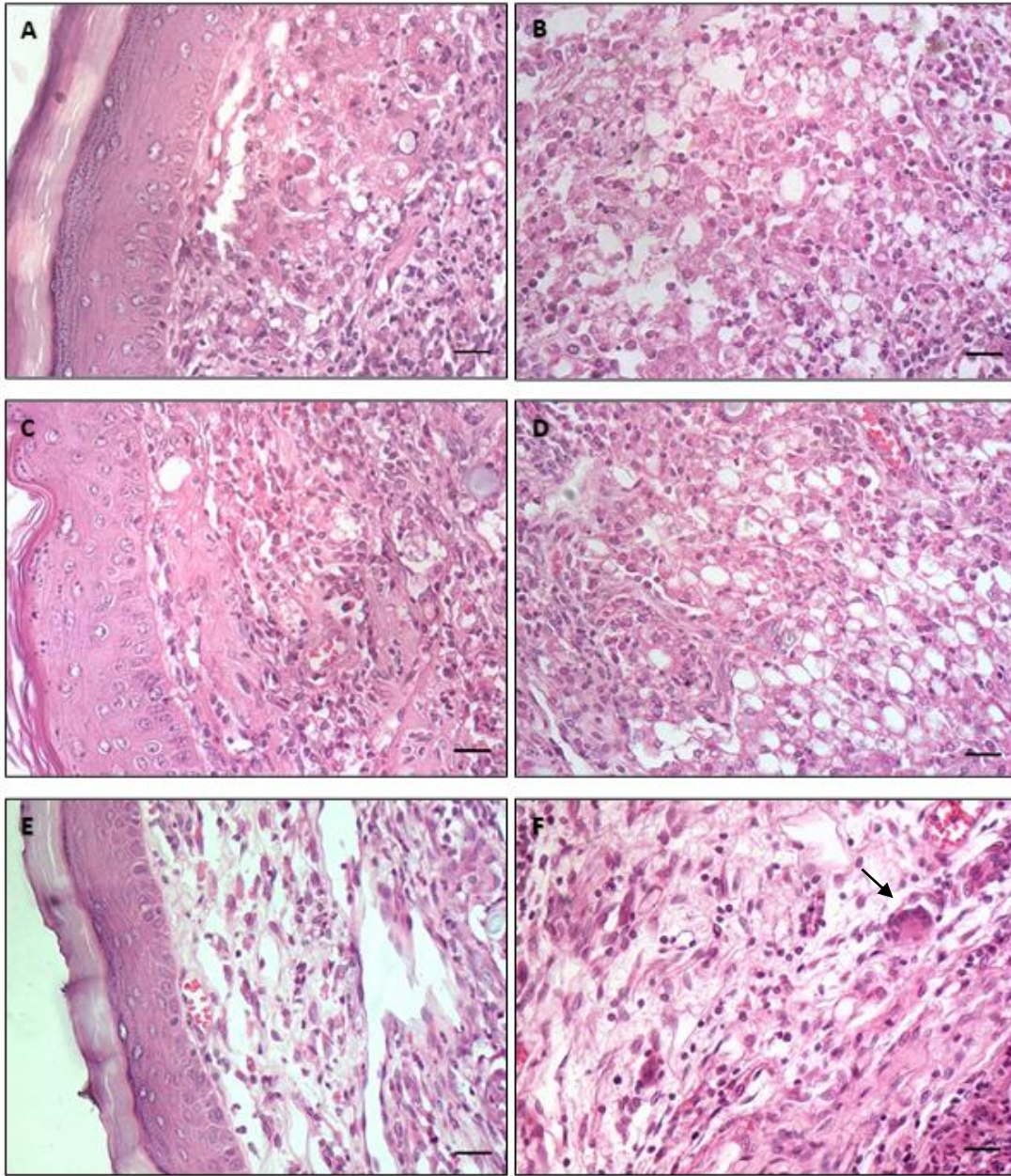


**Figura 13.** Inflamación del cojinete plantar y carga parasitaria en ratones (A, B) y hámsteres (C, D) infectados con promastigotes de *L. mexicana* y vacunados con el gen LmxMBA. La inflamación macroscópica de la almohadilla plantar se midió semanalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  los errores estándar de

la media (SEM) de diez ratones por grupo (A). El número de parásitos en la almohadilla plantar se determinó por el método de dilución limitante, los resultados se expresan como Log<sub>10</sub> (B). \*p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001.

### **Estudio histopatológico**

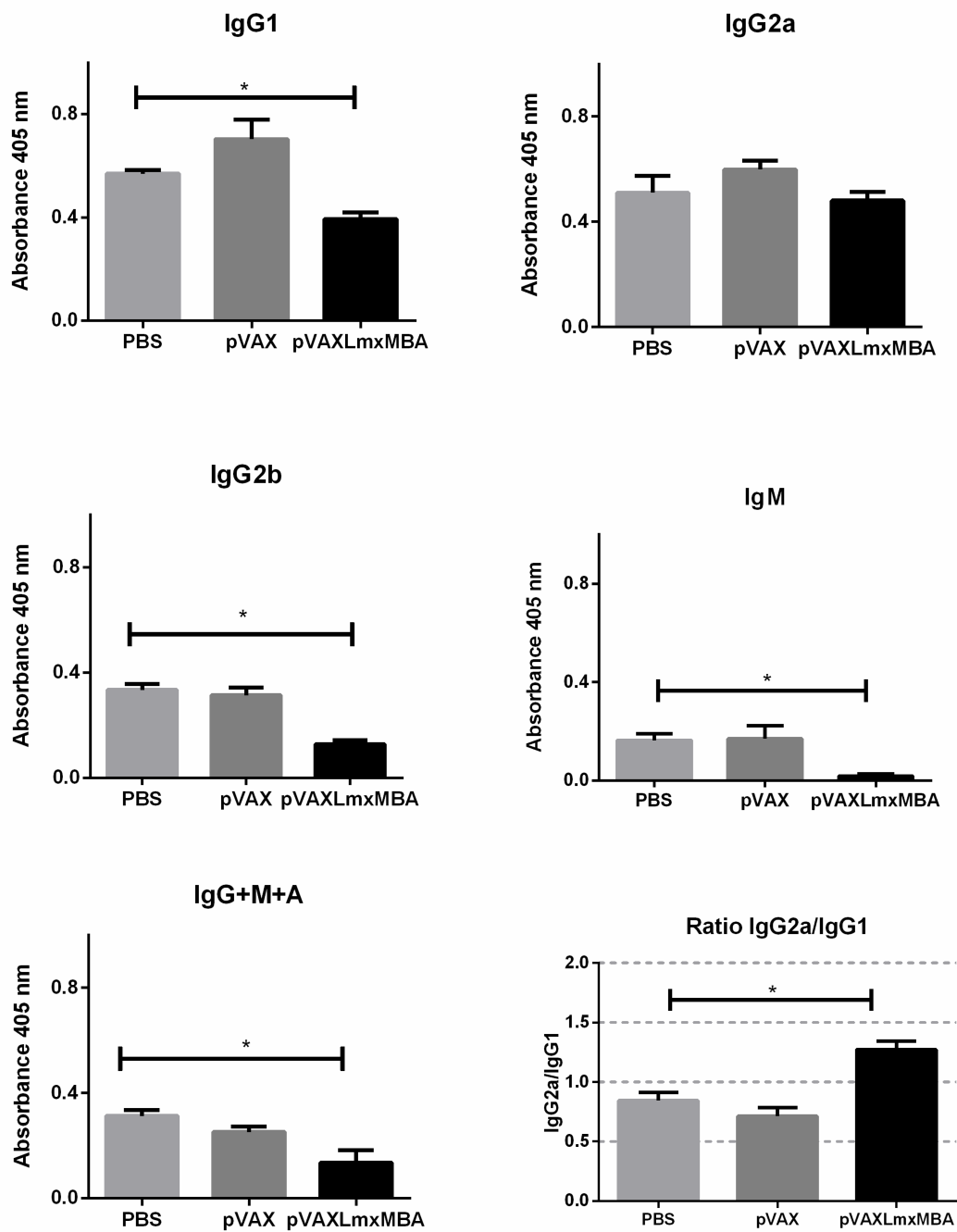
El estudio histopatológico del tejido infectado de hámster y ratón también mostró una menor carga parasitaria y poca o ninguna alteración histológica a nivel de la dermis o epidermis de los animales que fueron vacunados con el plásmido pVAX1::LmxMBA. Los animales control vacunados con PBS o con el plásmido vacío pVAX1, mostraron gran cantidad de parásitos en el sitio de inoculación (>200 por campo) (Figura 14 A-D). Los animales control también presentaron un infiltrado de células inflamatorias con abundantes células polimorfonucleares y mononucleares que ocupaban la dermis, y macrófagos vacuolados con elevado número de amastigotes en su interior. También se observó una región dérmica desorganizada, con pérdida de la morfología normal, reemplazada por un intenso infiltrado inflamatorio crónico. Por el contrario, los hámsteres y ratones vacunados terapéuticamente con el plásmido pVAX1::LmxMBA mostraron una menor frecuencia de macrófagos parasitados, así como menos amastigotes en el sitio de la infección (0-20 por campo) en comparación con los grupos control (Figura 14E). Al mismo tiempo, se observó una dermis con menor infiltrado inflamatorio y adicionalmente, la presencia de células gigantes fue evidente en el tejido cutáneo del 75% de los hámsteres vacunados con el gen LmxMBA (Figura 14F).



**Figura 14.** Histopatología de la piel de hámsteres infectados con *L. mexicana* y vacunados terapéuticamente con el gen LmxMBA. Piel de hámsteres vacunados con PBS (A, B), con el vector vacío (C, D) y con el plásmido pVAX1::LmxMBA (E, F). Célula gigante (flecha). 600x.

## Isotipo de anticuerpos

Para comparar la respuesta de anticuerpos generados por la inmunización terapéutica con el plásmido pVAX1::LmxMBA y controles, se determinaron los isotipos de anticuerpos anti-LmxMBA producidos por la vacunación de ratones con ADN. Los sueros colectados de ratones vacunados se analizaron para detectar la presencia de los isotipos de anticuerpos mediante ELISA indirecto. Al comparar los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas en diferentes grupos de ratones, se observó un nivel bajo de IgG1 en animales vacunados con el antígeno de interés y el nivel más alto en el grupo control inmunizado con PBS. Por otro lado, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IgG2 entre los ratones vacunados con pVAX1::LmxMBA y los ratones de control (Figura 15). En todos los grupos de ratones, los niveles de IgG3 e IgA permanecieron bajos. La relación IgG2a/IgG1 fue mayor en ratones vacunados con pVAX1::LmxMBA, y la diferencia con los controles fue estadísticamente significativa. Esta relación no difirió significativamente entre ratones vacunados con PBS o pVAX. Como se muestra en la figura 15, los valores de IgG + M + A anti LmxMBA fueron significativamente más bajos que los grupos control.



**Figura 15.** Respuestas serológicas específicas de la vacunación terapéutica. Las muestras de suero se recolectaron por punción cardíaca el día 105 posinfección. Las placas se recubrieron con 2 µg / ml de rLmxMBA y las muestras de suero se diluyeron 1: 100. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar de las densidades ópticas. \* p < 0.05



## 11. DISCUSION

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que afecta a más de 98 países. Aproximadamente 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se registran en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia central. El tratamiento actual tiene efectos adversos hepáticos, cardíacos y teratogénicos<sup>10</sup> que, junto con el incumplimiento y el abandono del tratamiento, debido a los esquemas de administración prolongados, conducen a la aparición de parásitos resistentes a los medicamentos<sup>16,81</sup>. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas profilácticas y terapéuticas que permitan la resolución de la enfermedad y que sean más seguras para los pacientes en términos de mejor adherencia a los protocolos<sup>17,82</sup>.

El control de la leishmaniasis mediante la vacunación es un desafío prometedor. Varias vacunas atenuadas y basadas en proteínas han generado protección variable frente a diferentes especies de *Leishmania* en distintos modelos animales; sin embargo algunas de ellas presentan desventajas intrínsecas, como el riesgo de reversión a la virulencia y la selección y uso de adyuvantes, respectivamente<sup>83-85</sup>. La vacunación con ADN plasmídico es un área activa de investigación aplicada al cáncer y patógenos microbianos asociados a infecciones intracelulares<sup>86,87</sup>. Se ha reportado que las vacunas de ADN persisten en el músculo esquelético durante al menos 19 meses, son fáciles de producir con alta pureza y presentan mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, lo que permite prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales<sup>35,88</sup>. La vacunación con ADN se ha probado contra diferentes enfermedades debido a su potencial para inducir respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares y representa un enfoque importante para el diseño de vacunas contra la leishmaniasis<sup>89</sup>.

Los avances en el diseño de antígenos, las formulaciones mejoradas, la inclusión de adyuvantes moleculares y los métodos físicos de administración han mejorado la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. El rendimiento mejorado ha estimulado un interés renovado en la plataforma, que se refleja en los numerosos ensayos

clínicos en curso que investigan vacunas de ADN para aplicaciones preventivas y terapéuticas <sup>90,91</sup>. Hay varias vacunas basadas en genes aprobadas para su uso en la práctica veterinaria para combatir el melanoma canino - *Oncept (Merial)*, el virus del Nilo Occidental equino - *Innovatortm (Wyeth)*, el virus de la necrosis hematopoyética de los peces - *Apex-IHN (Novartis)* y la hormona del crecimiento porcina - *LifeTide SW 5.0 (Inovio Pharmaceuticals)*. En humanos, actualmente hay 570 ensayos clínicos que evalúan el uso de vacunas de ADN contra enfermedades infecciosas y no infecciosas enumeradas en la base de datos [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). La mayoría de estos ensayos están investigando vacunas para el VIH o cánceres. En cuanto a otras enfermedades infecciosas, se encuentran ensayos clínicos contra la influenza, la hepatitis B y C, el VPH, la malaria e incluso el SARS-COV-2 más recientemente <sup>44,45,90,92,93</sup>.

En estudios anteriores <sup>78</sup>, identificamos un candidato potencial para una vacuna protectora mediante vacunología reversa. Los criterios por los cuales se seleccionó el antígeno de la vacuna candidata inicialmente incluyeron un enfoque en las proteínas de superficie y la conservación de la secuencia entre las especies de *Leishmania*. Otras consideraciones fueron que el candidato elegido debía carecer de identidad de secuencia con proteínas humanas y la capacidad de expresar la proteína con alto rendimiento para la producción de vacunas, por ejemplo, descartamos proteínas insolubles con más de dos hélices transmembrana. En este sentido, la proteína LmxMBA tiene una identidad de solamente un 26,9% con una proteína humana. Sin embargo, lo que es más importante, no tiene secuencias compartidas superiores a seis aminoácidos y, por lo tanto, es poco probable que contenga epítomos compartidos de MHC I o II. Por lo cual, se espera que esta proteína no tenga problemas de seguridad si se administrara durante los ensayos clínicos de vacunas.

La infección por *L. mexicana* causa muchos casos de LC en las Américas y, con menos frecuencia, leishmaniasis mucocutánea y cutánea difusa, formas aún más desfigurantes de la enfermedad. *L. major* también puede causar LC, especialmente en el Viejo Mundo, y por otro lado, la forma más mortal de la enfermedad, la LV es

causada principalmente por *L. donovani* y *L. infantum*<sup>94,95</sup>. Por lo tanto, si el antígeno seleccionado se conserva en las diversas especies de *Leishmania*, sería posible que una vacuna dirigida contra especies que ocasionen LC podría proteger contra estas otras formas de leishmaniasis. En este aspecto, la región extramembranal de la proteína LmxMBA, seleccionada en este estudio, tiene una identidad > 90% con homólogos de *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum*. Incluso al considerar las especies más distantes que pertenecen al subgénero alterno *Viannia*, el antígeno candidato exhibe al menos un 71% de conservación de la secuencia con las especies de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guayanensis*.

Según el análisis *in silico*, LmxMBA es una proteína expuesta en la membrana de *L. mexicana* y pertenece a una fosfatasa ácida expresada en promastigotes y amastigotes<sup>78</sup>. El gen LmxMBA<sup>80</sup> y sus homólogos en *T. brucei*<sup>96</sup> codifican proteínas que se han observado en pequeñas estructuras similares a vesículas cercanas al bolsillo flagelar, y la sobreexpresión de proteínas en promastigotes de *L. mexicana* conduce a la translocación de la proteína a la superficie celular y a la membrana del bolsillo flagelar.

En este estudio, encontramos a la proteína LmxMBA ubicada principalmente en la membrana del bolsillo flagelar de promastigotes y amastigotes de tipo silvestre. Su localización es menos frecuente en la superficie o en los orgánulos del parásito, incluido el flagelo. Se ha demostrado que las proteínas localizadas en la membrana plasmática representan el grupo más accesible de posibles blancos para el desarrollo de vacunas. Por lo tanto, LmxMBA como proteína unida a la membrana, podría representar un candidato ideal para el desarrollo de una vacuna de ADN contra *L. mexicana*.

Hay varios componentes clave involucrados en la respuesta inmune a la infección por *Leishmania*. El resultado de la infección depende de la capacidad del hospedero para montar una respuesta Th1 protectora frente a la capacidad del parásito para evadir y manipular el sistema inmunológico del hospedero. Se considera que distintos tipos celulares tales como macrófagos, células dendríticas, células T cooperadoras, células T citotóxicas, células asesinas naturales, junto con moléculas

efectoras, desempeñan un papel esencial en la respuesta inmunitaria a la infección por *Leishmania* <sup>97</sup>. En este estudio, la vacuna de ADN que codifica LmxMBA de *L. mexicana* fue capaz de evitar las manifestaciones clínicas graves de la enfermedad cutánea en ratones genéticamente susceptibles y promover respuestas inmunes humorales y celulares.

La mayoría de los animales (70%) vacunados profilácticamente con el plásmido candidato no mostraron inflamación macroscópica de las patas a los 105 días después del reto parasitario, los parásitos se eliminaron del sitio de inyección y la dermis estaba libre de infiltrados inflamatorios. El resto de los animales de este grupo (30%) mostró una hinchazón mínima y transitoria en el sitio de inoculación y un número bajo de parásitos e infiltrados inflamatorios leves. Cabe señalar que se observó un retraso en el desarrollo de la enfermedad en todos los animales inmunizados con el gen LmxMBA. En la infección cutánea por *L. major*, la vacunación con la parte divergente de la proteína H2B confiere una protección clínica y parasitológica frente a un reto parasitario, considerado como efecto protector cuando el tamaño de la lesión y la carga parasitaria en los ratones vacunados fue significativamente menor que el observado en los animales de control <sup>98</sup>. En el modelo experimental de ratón de leishmaniasis visceral causada por *L. donovani*, Melby *et al.*<sup>99</sup> mostraron que la vacunación con ADN, utilizando una biblioteca de ADNc que contiene notablemente H2B, protege parcialmente a los ratones BALB/c contra un reto parasitario con *L. donovani*. El efecto protector inducido por la vacuna fue parcial, ya que, durante la infección en este modelo experimental, la vacunación fue más eficaz para eliminar los parásitos del hígado que del bazo.

En nuestro trabajo, la inmunización con el plásmido vacío generó lesiones macroscópicas en todos los animales de este grupo (100%), aunque el tamaño fue ligeramente menor que las lesiones del grupo control PBS, la carga parasitaria se mantuvo alta y hubo daño tisular con presencia de infiltrados inflamatorios crónicos. Este aparente efecto protector parcial puede deberse a la presencia de motivos CpG. El vector vacío tiene motivos CpG que actúan como una "señal de peligro" y

como un potenciador de la respuesta inmune Th1 en la vacunación con ADN a través de la interacción con células positivas para TLR9 y esto podría estar activando una respuesta inmune inespecífica contra la infección <sup>24,64</sup> y, por lo tanto, provocando una menor inflamación macroscópica sin reducción de la carga parasitaria.

Como era de esperarse, la presencia de parásitos en la lesión fue evidente en todos los animales de los grupos control teñidos con H&E. Sin embargo, en el grupo de animales inmunizados con el antígeno candidato, sólo 20% mostró parásitos por piel teñida y el 10% más por ensayos de dilución limitante; esto concuerda con otros estudios en ratones, ya que al análisis de la carga parasitaria por la técnica de dilución limitante permite su cuantificación con una sensibilidad que es al menos 50 a 100 veces mayor a la alcanzada cuando se cuantifican las cargas parasitarias en órganos teñidos <sup>100</sup>. Debido a su alta sensibilidad, este método es particularmente adecuado para situaciones experimentales en las que los parásitos no pueden visualizarse en órganos teñidos: por ejemplo, después de una intervención terapéutica o una baja persistencia del parásito. Sería interesante ampliar el tiempo de seguimiento de los animales para observar la completa eliminación del parásito en el tejido infectado o la persistencia. No obstante, una característica importante de la leishmaniasis es que, a pesar de la desaparición de la lesión, los parásitos residuales podrían permanecer en el hospedero, probablemente durante mucho tiempo <sup>101</sup>.

La vacunación con el plásmido candidato estuvo respaldada por una respuesta de tipo Th1, ya que los ratones inmunizados con pVAX1::LmxMBA produjeron niveles significativamente más altos de IgG2 en comparación con los ratones control, que, a la inversa, mostraron niveles significativamente altos de IgG1. Muchos informes muestran que durante la infección por *Leishmania*, cantidades más altas del isotipo IgG1 en comparación con IgG2a se asocian con la progresión de la enfermedad <sup>102,103</sup>. Esta relación  $IgG2a/IgG1 > 1$  es representativa de una respuesta inmune de tipo Th1 en ratones, el IFN- $\gamma$ , producido por células similares a Th1, suprime la inducción de IgG1 y aumenta la producción de anticuerpos IgG2 <sup>104</sup>. Por otro lado,

los niveles de IgM, IgG2b e IgG3 fueron significativamente más bajos en el grupo experimental en comparación con los ratones de control. Se ha evaluado la respuesta inmune humoral en diferentes estadios de la enfermedad en humanos con leishmaniasis y se han encontrado niveles elevados de anticuerpos IgM en el suero de pacientes con leishmaniasis visceral que se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, los niveles de IgM permanecen altos en pacientes resistentes a estibogluconato de sodio (SAG) y la resolución, en pacientes que responden a SAG, se correlaciona con una disminución en los niveles de IgG totales, IgM, IgE <sup>105</sup>.

La validación terapéutica *in vivo* en los dos modelos animales (ratón y hámster), mostró que la vacunación con el plásmido generó una mejoría clínica en hámsteres (75%) y ratones (70%) que implicó menor daño en el tejido con la presencia de células gigantes y la ausencia de parásitos, similar a la inmunopatología de la piel durante la fase curativa de la leishmaniasis cutánea en humanos, caracterizada por la disminución gradual de macrófagos y parásitos, fibrosis dérmica y presencia de granulomas epitelioides y células gigantes <sup>106</sup>. Los animales que respondieron en menor medida a la vacunación terapéutica pudieron controlar parcialmente el tamaño de la lesión, lo que indica que la vacuna con pVAX1::LmxMBA pudo desacelerar la evolución de la infección por el parásito y lograr idealmente concentraciones indetectables del parásito sin necesidad del tratamiento antiparasitario regular. Además de desacelerar la evolución de la lesión a ulcera, podría reducir la probabilidad de que las personas infectadas transmitan el parásito al vector y de esta manera a otras personas. Sin embargo, cabe señalar que este tipo de estrategia podría implicar el uso de otros medicamentos y terapias además de una vacunación terapéutica contra el parásito.

Se ha reportado que un parásito mutante por la delección de este gen puede infectar ratones BALB/c y macrófagos peritoneales, lo que sugiere que LmxMBA no está involucrado en el proceso de infección ni es necesario para la supervivencia del amastigote en la célula hospedera infectada <sup>107</sup>. Podría ser posible que la respuesta inmune inducida por la vacunación de ADN con el gen LmxMBA afecte la actividad

de LmxMBA o proteínas homólogas que sí son esenciales para la infección y supervivencia de amastigotes dentro del hospedero.

En conclusión, los resultados del presente estudio demostraron que la vacunación terapéutica y profiláctica con pVAX1::LmxMBA puede inducir una mejoría clínica gracias a una notable baja en la carga parasitaria contra la infección por *L. mexicana* en el modelo murino. Nuestros datos identifican un antígeno candidato que podría usarse potencialmente en campañas de vacunación en regiones endémicas de *L. mexicana* o en la vacunación del reservorio canino doméstico para reducir la transmisión a los seres humanos.

## 12. PERSPECTIVAS

- Determinar citocinas séricas en diferentes tiempos para corroborar el tipo de respuesta inducida por la inmunización con el plásmido candidato.
- Realizar ensayos de vacunación con ADN utilizando diferentes dosis del plásmido.
- Evaluar la eficacia de esta vacuna de ADN frente al reto parasitario con otras especies de *Leishmania* en animales grandes.
- Analizar los mecanismos inmunológicos involucrados en la respuesta.
- Estudiar la respuesta anamnésica a la reinfección.
- Evaluar a largo plazo la remisión de la infección.



### 13. BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Neglected tropical diseases. Leishmaniasis [Internet]. Global Health Observatory (GHO) data. 2019. p. [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishma](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishma).
2. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56:1031–41.
3. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2009;26:223–7.
4. Botero D, Restrepo M, Angel R, Parra GJ. *Parasitosis humanas*. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas. 1998.
5. Hall LR, Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;155:3501–6.
6. Marsella R, Gopegui RR De. *Leishmaniasis : a re-emerging zoonosis*. 1998;801–14.
7. World Health Organization. *Leishmaniasis Fact sheet N°375* [Internet]. 2014. p. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>.
8. Domínguez JR. Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2002;45:126–41.
9. Organización Panamericana de la Salud. *RePLEish. Segunda Reunión de los Programas Nacionales de Leishmaniasis en las Americas*. 2013.
10. Mcgwire BS, Satoskar AR. *Leishmaniasis : clinical syndromes and treatment*. *qj Med*. 2014;7–14.
11. Lawn SD, Whetham J, Chiodini PL, Kanagalingam J, Watson J. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis : an emerging health problem among British travellers. *QJ Med*. 2004;97:781–8.
12. Sundar S, Chakravarty J. *Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Taylor & Francis; 2013;14:53–63.
13. Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis : Clinical evidence for informed clinical risk management. 2007;3:733–40.
14. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India : Report from the Center. 2000;31:1104–7.
15. Masmoudi A, Maalej N, Boudaya S, Turki H, Zahaf A. Adverse effects of intralesional Glucantim® in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Médecine et maladies infectieuses*. 2006;36:226–8.
16. Ponte-sucre A, Gamarro F, Dujardin J, Barrett MP, Garci R, Pountain AW, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis : A 21st century

challenge. 2017;1–24.

17. Andrews KT, Fisher G, Skinner-adams TS. International Journal for Parasitology : Drugs and Drug Resistance Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Australian Society for Parasitology; 2014;4:95–111.

18. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. 2007;671–8.

19. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. International Journal for Parasitology. 1998;28:121–34.

20. Hall BF, Joiner KA. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. 1991;22–7.

21. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L. Leishmania surface protein gp 63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. 2008;221–30.

22. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clinical Microbiology Reviews. 2005;18:293–305.

23. Gutiérrez-kobeh L, Oyarzabal E De, Argueta J, Wilkins A, Salaiza N, Fernández E, et al. Inhibition of dendritic cell apoptosis by Leishmania mexicana amastigotes. 2013;1755–62.

24. Soong L. Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites. 2008;180:4355–60.

25. Vargas-inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct Roles for MyD88 and Toll-Like Receptor 2 during Leishmania braziliensis Infection in Mice □. 2009;77:2948–56.

26. Ota H, Takashima Y, Matsumoto Y, Hayashi Y. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-  $\gamma$  and IL-12 induces resistance to Leishmania major at the early phase of infection. journal of veterinary medicinal science. 2008;70:589–93.

27. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. 2008;15–25.

28. Hernández-Ruiz J, Carrada NS-SG, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, et al. CD8 Cells of Patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Display Functional Exhaustion : The Latter Is Reversed , In Vitro , by TLR2 Agonists. 2010;4.

29. Abdian N, Gholami E, Zahedifard F, Safaee N, Rafati S. Experimental Parasitology Evaluation of DNA / DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against Leishmania major infection in susceptible BALB / c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. Experimental Parasitology. Elsevier Inc.; 2011;127:627–36.

30. Silva Araújo MS, Andrade RA de, Sathler-Avelar R, Magalhães CP, Carvalho AT, Andrade MC, et al. Immunological changes in canine peripheral blood

leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011;141:64–75.

31. Singh B, Sundar S. *Leishmaniasis : Vaccine candidates and perspectives*. Vaccine. Elsevier Ltd; 2012;30:3834–42.

32. Nagill R, Kaur S. *Vaccine candidates for leishmaniasis : A review*. *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2011;11:1464–88.

33. Datta S, Roy S, Manna M. *Therapy with radio-attenuated vaccine in experimental murine visceral leishmaniasis showed enhanced T cell and inducible nitric oxide synthase levels , suppressed tumor growth factor-beta production with higher expression of some signaling molecules*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Elsevier Editora Ltda; 2015;19:36–42.

34. Datta S, Adak R, Chakraborty P, Kumar A, Bhattacharjee S, Chakraborty A, et al. *Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis*. *Experimental Parasitology*. Elsevier Inc.; 2012;130:39–47.

35. Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. *DNA vaccines: A key for inducing long-term cellular immunity*. *Current Opinion in Immunology*. 2000;12:442–7.

36. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. *DNA vaccines : improving expression of antigens*. 2003;5:1–5.

37. Seder RA, Hill AVS. *Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity*. *Nature*. 2000;406:793–8.

38. Tüting T, Austyn J, Storkus WJ, Jr LDF. *The Immunology of DNA Vaccines*. *Methods in Molecular Medicine*. 29.

39. Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, et al. *Distribution of DNA Vaccines Determines Their Immunogenicity After Intramuscular Injection in Mice*. *The Journal of Immunology*. 2000;165:2850–8.

40. Boyle JS, Silva A, Brady JL, Lew AM. *DNA immunization : Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity*. 1997;94:14626–31.

41. Fan H, Lin Q, Morrissey GR, Khavari PA. *Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin*. 1999;17:5–7.

42. Liebert MA, Sin J, Bagarazzi M, Pachuk C, Weiner DB. *DNA Priming – Protein Boosting Enhances Both Antigen- Specific Antibody and Th1-Type Cellular Immune Responses in a Murine Herpes Simplex Virus-2 gD Vaccine Model*. 1999;18:771–9.

43. Yan J, Reichenbach DK, Corbitt N, Hokey D, Mathura P, McKinney KA, et al. *Induction of Antitumor Immunity In vivo Following Delivery of a Novel HPV-16 DNA Vaccine Encoding an E6/E7 Fusion antigen*. *vaccine*. 2015;27:431–40.

44. Yan J, Harris K, Khan AS, Draghia-akli R, Sewell D, Weiner DB. *Cellular immunity induced by a novel HPV18 DNA vaccine encoding an E6 / E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques*. 2008;26:5210–5.

45. Yu J, Tostanoski LH, Mahrokhian SH, Nkolola JP, Liu J, Li Z, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. 2020;811:806–11.
46. WHO. Draft Landscape of COVID-19 Candidate Vaccines.
47. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*. Nature Publishing Group; 2014;3:e13.
48. Xu D, Liew FL. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface. 1999;84:173–6.
49. Ben S, Ahmed H, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. 2004;22:1631–9.
50. Sjölander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E, Baldwin TM, Curtis JM, et al. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1998;160:3949–57.
51. Noormohammadi AH, Hochrein H, Curtis JM, Baldwin TM, Handman E. Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. 2001;19:4043–52.
52. Walker PS, Scharon-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, et al. Genetic immunization with Glycoprotein 63 cDNAa Helper T Cell Type 1 Immune of Response Results in a and Protection in Murine Model Leishmaniasis. 1998;1907:1899–907.
53. Basu R, Roy S, Walden P. HLA Class I–Restricted T Cell Epitopes of the Kinetoplastid Membrane Protein–11 Presented by *Leishmania donovani*–Infected Human Macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*. Nature Publishing Group; 2007;195:1373–80.
54. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid Membrane Protein-11 DNA Vaccination Induces Complete Protection against Both Pentavalent Antimonial-Sensitive and -Resistant Strains of *Leishmania donovani* That Correlates with Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and IL-4 Generation: Ev. *The Journal of Immunology*. 2005;174:7160–71.
55. Ojeda A, Laura L, Tim M, Francino O, Alberola J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. 2007;25:7962–71.
56. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Feigner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against Influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993;259:1745–9.
57. Seder RA, Gurnathan S. DNA vaccines — Designer vaccines for the 21st century. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341:277–8.
58. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, et al. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine*. 2000;18:1893–901.

59. Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson A, Sandström E. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. 1998;351.
60. Wang R, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, et al. Induction of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Humans by a Malaria DNA Vaccine. 1998;282.
61. Krieg AM. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine*. 2000;19:618–22.
62. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, et al. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2005;129:913–27.
63. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ken J, Takeshita S, Gursel M, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *Journal of immunology*. 2001;167:3555–8.
64. Roman M, Martin-orozco E, Goodman S, Sato Y, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *nature medicine*. 1997;3:849–54.
65. Feltquate DM, Heaney S, Webster RC, Robinson H. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *The Journal of Immunology*. 2018;158:2278–84.
66. Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza Virus Nucleoprotein-Specific Immunoglobulin G Subclass and Cytokine Responses Elicited by DNA Vaccination Are Dependent on the Route of Vector DNA Delivery. 1996;70:6119–25.
67. Bojang KA, Olodude F, Pinder M, Ofori-anyinam O, Vigneron L, Fitzpatrick S, et al. Safety and immunogenicity of RTS , S / AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children. 2005;23:4148–57.
68. Martin T, Parker SE, Hedstrom R, Le T, Hoffman SL, Norman J, et al. Plasmid DNA malaria vaccine: The potential for genomic integration after intramuscular injection. *Human Gene Therapy*. 1999;10:759–68.
69. Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG, et al. Plasmid DNA Vaccines : Investigation of Integration into Host Cellular DNA following Intramuscular Injection in Mice. 2001;19486:258–72.
70. Mor GIL, Singla MANA V, Steinberg AD, Hoffman SL, Okuda K, Klinman DM. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Human Gene Therapy*. 1997;300:293–300.
71. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiops*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1984;78:25–34.
72. Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, Kaczmarek J, et al. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *International Immunology*. 2005;17:1347–

57.

73. Nieto A, Dominguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrion J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res.* 2011;42:39.

74. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. *The Journal of Immunology.* 2001;166:1912–20.

75. Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, de Freitas E, Melo MN, et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine.* 2008;26:5888–95.

76. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FSL, Raghava GPS, Flower DR, et al. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *trends in biotechnology.* 2008;26:190–200.

77. Rappuoli R. Reverse vaccinology , a genome-based approach to vaccine development. 2001;19:2688–91.

78. Burgos Reyes MA. 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. CINVESTAV; 2016.

79. Tabatabaie F, Mahdavi M, Faezi S, Dalimi A. Th1 Platform Immune Responses Against *Leishmania major* Induced by Thiol-Specific Antioxidant-Based DNA Vaccines. 2014;7:1–8.

80. Wiese M, Berger O, Stierhof YD, Wolfram M, Fuchs M, Overath P. Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996;82:153–65.

81. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V., Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World \_ Enhanced Reader.pdf. *Acta Tropica.* 2011;118:87–96.

82. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy.* 2018.

83. Poot J, Spreeuwenberg K, Sanderson SJ, Schijns VECJ, Mottram JC, Coombs GH, et al. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. 2006;24:2460–8.

84. River D, Shah R, Bovay P, Mauel J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunology.* 1993;15:75–84.

85. Campos-neto A, Porrozzi R, Greeson KAY, Coler RN, Webb JR, Seiky YAW, et al. Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens

- in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. 2001;69:4103–8.
86. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68:793–806.
87. Boyer JD, Chattergoon M, Muthumani K, Kudchodkar S, Kim J, Bagarazzi M, et al. Next generation DNA vaccines for HIV-1. *Journal of Liposome Research*. Taylor & Francis; 2002;12:137–42.
88. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Molecular Genetics*. 1992;1:363–9.
89. Billaut-Mulot O, Idziorek T, Loyens M, Capron A, Bahr GM. Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV-1 DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost. *Vaccine*. 2001;19:2803–11.
90. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: Current progress. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;53:296–302.
91. Hasson SSAA, Al-Busaidi JKZ, Sallam TA. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Hainan Medical University; 2015;5:344–53.
92. Smith TRF, Patel A, Ramos S, Elwood D, Zhu X, Yan J, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate. *Nature Communications*. Springer US; 2020;1–13.
93. Pantaleo G, Janes H, Karuna S, Grant S, Ouedraogo GL, Allen M, et al. Safety and immunogenicity of a multivalent HIV vaccine comprising envelope protein with either DNA or NYVAC vectors ( HVTN 096 ): a phase 1b , double-blind , placebo-controlled trial. *The Lancet HIV*. The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an Open Access article under the CC BY 4.0 license; 6:e737–49.
94. Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;75:1074–7.
95. Dye C. The leishmaniasis in biology and medicine. *Parasitology Today*. 1988.
96. Engstler M, Weise F, Bopp K, Grünfelder CG, Günzel M, Heddergott N, et al. The membrane-bound histidine acid phosphatase TbMBAP1 is essential for endocytosis and membrane recycling in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*. 2005;118:2105–18.
97. Vanloubbeeck Y, Jones DE. The Immunology of *Leishmania* Infection and the Implications for Vaccine Development. 2004;272:267–72.
98. Chenik M, Louzir H, Ksontini H, Dilou A, Abdmouleh I, Dellagi K. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB / c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. 2006;24:2521–9.
99. Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, et al. Identification of Vaccine Candidates for Experimental Visceral Leishmaniasis by

Immunization with Sequential Fractions of a cDNA Expression Library. 2000;68:5595–602.

100. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJF, Nassar N. Culture Microtitration : a Sensitive Method for Quantifying *Leishmania infantum* in Tissues of Infected Mice. 1995;39:2167–8.

101. Schubach A, Haddad F, Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G. Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. 1998;178:911–4.

102. Thakur A, Kaur H, Kaur S. Evaluation of the immunoprophylactic potential of a killed vaccine candidate in combination with different adjuvants against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology International*. Elsevier Ireland Ltd; 2015;64:70–8.

103. Jaafari MR, Ghafarian A, Farrokh-gisour A, Samiei A, Tavassoti M, Mahboudi F, et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* ( rgp63 ) reconstituted with liposomes in BALB / c mice. 2006;24:5708–17.

104. Snapper C., Paul W. Interferon- $\gamma$  and B Cell Stimulatory Factor-I Reciprocally Regulate Ig Isotype Production. 1987;1:4–7.

105. Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, et al. Differential Decline in *Leishmania* Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G ( IgG ), IgM , IgE , and IgG Subclass Antibodies in Indian Kala-Azar Patients after Chemotherapy. 1999;67:6663–9.

106. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2012;34:551–61.

107. Benzel I, Weise F, Wiese M. Deletion of the gene for the membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000;111:77–86.