



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



PROBIOL
PROGRAMA DE POSGRADO
EN BIOLOGÍA

**Desarrollo y evaluación de vacunas de primera y
tercera generación contra la leishmaniosis
formuladas con nanopartículas inmunoestimulantes y
agonistas de receptores tipo Toll**

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias Biológicas

Autora: María José Germanó

Director: Dr. Diego Esteban Cargnelutti

Co-director: Dr. Juan Pablo Mackern-Oberti

Lugar: Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)

CONICET, Mendoza, Argentina



2021



ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
AGRADECIMIENTOS.....	10
ABREVIACIONES	12
RESUMEN	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
INTRODUCCIÓN	21
Generalidades	21
Epidemiología.....	21
Etiología.....	23
Agente etiológico	23
Vector	24
Hospedadores reservorios	25
Ciclo de vida	25
Formas clínicas de la leishmaniosis.....	26
Leishmaniosis visceral	27
Leishmaniosis cutánea	27
Respuesta inmune frente a la infección por <i>Leishmania</i>	29
Rol del sistema inmune innato frente a la infección por <i>Leishmania</i>	29
Rol del sistema inmune adaptativo frente a la infección por <i>Leishmania</i>	30
Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de <i>Leishmania</i>	31
Tratamiento contra la leishmaniosis.....	32
Tratamiento de primera línea	32
Tratamiento de segunda línea	32
Control de la leishmaniosis canina.....	32
Vacunas contra la leishmaniosis	33
Clasificación de las vacunas.....	33
Proteína LOxy como antígeno vacunal de tercera generación	33
Adyuvantes.....	34

Avances en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis humana	35
Vacunas comerciales contra la leishmaniosis canina.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Animales de experimentación.....	47
Cultivo de parásitos.....	47
Obtención de Antígenos Totales de <i>L. amazonensis</i> (ATL)	47
Análisis del perfil proteico de los ATL	47
Obtención de la proteína recombinante rLOxy de <i>L. infantum</i>	48
Análisis de las fracciones obtenidas e identificación de la proteína rLOxy.....	48
Obtención de liposomas catiónicos y formulaciones vacunales de tercera generación	49
Caracterización biofísica de las formulaciones	50
Determinación de tasa de encapsulación proteica.....	51
Esquema de vacunación para vacunas de primera generación.....	51
Esquema de vacunación para vacunas de tercera generación	53
Análisis de la respuesta inmune humoral	53
Cultivo primario de esplenocitos	54
Análisis de la respuesta inmune celular	54
Determinación de citoquinas	54
Análisis de la proliferación celular	54
Evaluación de la protección conferida por las formulaciones vacunales	54
Esquema de inmunización e infección para vacunas de primera generación	54
Esquema de inmunización e infección para vacunas de tercera generación	55
Evaluación del seguimiento de la infección por <i>L. amazonensis</i>	56
Índice esplénico.....	56
Carga parasitaria en animales infectados con <i>L. amazonensis</i>	57
Carga parasitaria en animales infectados con <i>L. infantum</i>	57
Identificación de antígenos inmunodominantes	58
Obtención de proteínas totales de <i>L. amazonensis</i>	58
Isoelectroenfoque (IEF).....	58
Electroforesis (Segunda dimensión).....	59
Tinción de geles.....	59
Western blot.....	59
Digestión proteica	59
Análisis por espectrometría de masas	60

Identificación de proteínas.....	60
Determinación del peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas identificadas	60
Análisis estadístico	61
RESULTADOS	63
Obtención de promastigotes de <i>Leishmania in vitro</i>	63
Curva de crecimiento de <i>L. amazonensis</i>	63
Curva de crecimiento de <i>L. infantum</i>	63
Desarrollo y evaluación de vacunas de primera generación contra la leishmaniosis.....	64
Producción y análisis de antígenos de primera generación de <i>L. amazonensis</i>	64
Evaluación de la respuesta inmune generada por los antígenos de primera generación ..	65
Evaluación de la respuesta inmune generada por vacunas de primera generación	67
Evaluación de la protección conferida por vacunas de primera generación contra la infección por <i>L. amazonensis</i>	71
Identificación de antígenos inmunodominantes en vacunas de primera generación.....	73
Análisis de la conservación filogenética de las proteínas identificadas.....	75
Desarrollo y evaluación de vacunas de tercera generación contra la leishmaniosis.....	76
Análisis de la conservación filogenética de LOxy	76
Producción y análisis de la proteína recombinante rLOxy de <i>L. infantum</i>	77
Caracterización física de las formulaciones vacunales de tercera generación	77
Evaluación de la respuesta inmune generada por vacunas de tercera generación.....	78
Evaluación de la protección conferida por vacunas de tercera generación contra la infección por <i>L. amazonensis</i>	79
Evaluación de la protección conferida por vacunas de tercera generación contra la infección por <i>L. infantum</i>	80
DISCUSION.....	83
CONCLUSIONES	92
PERSPECTIVAS	94
ANEXO	95
REFERENCIAS.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniosis visceral (a) y cutánea (b).....	22
Figura 2. Distribución de la leishmaniosis humana cutánea (a), mucocutánea (b) y visceral (c) en Argentina.....	23
Figura 3. Morfología de los parásitos de <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 4. Hembra del insecto vector <i>Lutzomyia</i>	25
Figura 5. Ciclo biológico del parásito de <i>Leishmania</i>	26
Figura 6. Paciente con leishmaniosis visceral.....	27
Figura 7. Leishmaniosis cutánea localizada.....	28
Figura 8. Leishmaniosis cutánea difusa.....	29
Figura 9. Leishmaniosis mucocutánea.....	29
Figura 10. Respuesta inmunológica frente a la infección por <i>Leishmania</i> spp.....	31
Figura 11. Esquema del funcionamiento del equipo de rastreamiento de nanopartículas (NTA).....	52
Figura 12. Esquema de inmunización correspondiente al protocolo Nro 1.....	53
Figura 13. Esquema de inmunización correspondiente al protocolo Nro 2.....	53
Figura 14. Esquema de inmunización e infección de los protocolos de vacunas de primera generación.....	56
Figura 15. Esquema de inmunización e infección de la vacuna de tercera generación siguiendo el protocolo Nro 7.....	57
Figura 16. Esquema de inmunización e infección de la vacuna de tercera generación siguiendo el protocolo Nro 8.....	57
Figura 17. Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	64
Figura 18. Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. infantum</i>	64
Figura 19. Perfil proteico de los ATL.....	66
Figura 20. Respuesta inmune humoral en ratones inoculados con los diferentes ATL.....	67
Figura 21. Respuesta inmune celular generada en ratones inoculados con los diferentes ATL.....	68
Figura 22. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con ATLs + Poly (I:C).....	69
Figura 23. Respuesta inmune celular generada en ratones inmunizados con ATLs + Poly (I:C).....	70
Figura 24. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con ATLf o ATLs combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763.....	71
Figura 25. Respuesta inmune celular generada en ratones inmunizados con ATLf o ATLs combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763.....	71

Figura 26. Ensayo de protección en animales inmunizados con ATLS + Poly (I:C) frente a la infección por <i>L. amazonensis</i>	73
Figura 27. Ensayo de protección en animales inmunizados con ATLf o ATLS + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 frente a la infección por <i>L. amazonensis</i>	74
Figura 28. Análisis de <i>western blot</i> y perfil proteico de antígenos totales de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> en geles bidimensionales.....	75
Figura 29. Resultados del análisis filogenético de la proteína LiHyp1 en BLASTp utilizando la base de datos del género <i>Leishmania</i>	77
Figura 30. Obtención de la proteína rLOxy.....	78
Figura 31. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con vacunas de tercera generación.....	80
Figura 32. Ensayo de protección en animales inmunizados con vacunas de tercera generación frente a la infección por <i>L. amazonensis</i>	81
Figura 33. Ensayo de protección en animales inmunizados con vacunas de tercera generación frente a la infección por <i>L. infantum</i>	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de ensayos clínicos de vacunas contra la leishmaniosis humana.....	39
Tabla 2. Comparación de ensayos clínicos de vacunas contra la leishmaniosis canina.....	44
Tabla 3. Formulaciones obtenidas utilizando la proteína rLOxy y/o liposomas catiónicos.....	51
Tabla 4. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 1.....	52
Tabla 5. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 2.....	53
Tabla 6. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 3.....	54
Tabla 7. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 4.....	54
Tabla 8. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 5.....	56
Tabla 9. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 6.....	56
Tabla 10. Resultado del análisis por alineamiento de los fragmentos obtenidos en la espectrometría de masa.....	76
Tabla 11. Caracterización física de las formulaciones vacunales contenidas en vesículas.....	79



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Mi principal agradecimiento se lo dedico a mi mamá, por su aliento constante y a mi papá por la confianza puesta en mí, que han sido imprescindibles y me han ayudado para llegar hasta este lugar. A mi hermana, hermanos y familia que gracias a su alegría permitieron que me mantuviera a flote.

Mi especial agradecimiento a Diego, mi director, mi principal guía en esta etapa, quien me brindó no sólo sus conocimientos sino también su apoyo, predisposición y todo lo que estuvo a su alcance para poder llevar a cabo este trabajo.

A mi co-director JP, quien además de su apoyo moral, siempre aportó sus grandes conocimientos con humildad y humanismo.

Mi eterno agradecimiento a Ana Paula Fernandes, quien me abrió las puertas de su laboratorio en la UFMG, fue una gran impulsora de objetivos de la tesis quien con total altruismo brindó todo su conocimiento.

A Victoria S, Esteban L, Eduardo S del Laboratorio de Inmunología y Desarrollo de Vacunas, quienes generosamente han estado dispuestos a ayudarme.

A Cristina S, quien amorosamente me permitió formar parte del área de parasitología de al FCM, UNCuyo y ha contribuido con sus conocimientos al desarrollo de esta tesis.

A mis tutores, Cristina S, Ana Paula F, Miguel Ángel S, por su compromiso y dedicación, quienes a través de sus aportes han permitiendo mejorar este trabajo.

Un reconocido agradecimiento a todo el personal del IMBECU quienes construyen un lugar armonioso y colaborativo, donde es placentero trabajar.

A mis compañeras y compañeros del IMBECU, por su amistad que nació desde el aprendizaje, pero se volvió parte fundamental durante esta etapa.

A la UNCuyo y en especial a PROBIOL y las personas que allí trabajan para responder las dudas y dar el apoyo necesario para lograr el objetivo.

A la Secretaría de Investigación Internacionales y Posgrado (SIIP) de la UNCuyo por las gestiones efectuadas para poder obtener las becas de movilidad.

A CONICET, por la beca otorgada, que sin ella no hubiera sido posible llevar a cabo esta tesis.

A mis amigos quienes de cerca y de lejos me han apoyado y han sido mi cable a tierra.



ABREVIACIONES

ABREVIACIONES

2D: dos dimensiones
ACK: cloruro de amonio potasio
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico
ALM: promastigotes de *L. major* autoclavados
ANOVA: análisis de la varianza
APC: células presentadoras de antígeno
APD: almohadilla plantar derecha
API: almohadilla plantar izquierda
ARN: ácido ribonucleico
ATL: antígenos totales de *Leishmania amazonensis*
ATLa: antígenos totales de *Leishmania amazonensis* obtenidos por autoclavado
ATLf: antígenos totales de *Leishmania amazonensis* obtenidos por congelamiento/descongelamiento
ATLp: antígenos totales de *Leishmania amazonensis* obtenidos por pasteurizado
ATLs: antígenos totales de *Leishmania amazonensis* obtenidos por sonicado
BCA: ácido bicinconínico
BCG: *bacillus* Calmett-Guerin
BLASTp: Basic Local Alignment Search Tool protein-protein
BSA: albúmina sérica bovina
CCAC: Canadian Council on Animal Care
CCT: Centro Científico Tecnológico
CHOL: colesterol
CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CpG: citosina fosfato guanina
Ct: umbral de ciclo
D.O.: densidad óptica
DC: células dendríticas
mDC: células dendríticas mieloides
DLS: dynamic light scattering
DMEM: medio Dulbecco's Modified Eagle
DMSO: dimetilsulfóxido
CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
DOTAP: clorato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N-trimetilamonio
DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
DRV: deshidratación-rehidratación de vesículas
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
ER: tasa de encapsulación
ESI: ionización por electrospray
ETD: enfermedades tropicales desatendidas

FCM: Facultad de Ciencias Médicas
FnRs: receptores de fibronectina
GLA-SE: glucanopiranosil lípido A - emulsión estable
GM-CSF: factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos
GRD: gradiente
HEPES: ácido 2-[4-(2-hiroxietyl)piperazin-1-il]etanosulfónico
His: histidina
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HRP: peroxidasa de rábano
i.d.: intradérmica
IDRI: Infectious Disease Research Institute
IEF: isoelectroenfoque
IFN: interferón
IgG: inmunoglobulina G
i.l.: intralinfática
IL: interleuquina
IMBECU: Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo
iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible
i.p.: intraperitoneal
IP: índice de polidispersión
IPE: Instituto de Patología Experimental
IPG: *immobilized pH gradient*
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IT: trampa iónica
i.v.: intravenosa
L.: *Leishmania*
LB: Luria Bertani
LC: liposomas catiónicos
LC-MS/MS: cromatografía líquida-espectrometría de masa en tándem
LeIF: *Leishmania elongation initiation factor*
LmSTI1: *L. major stress-inducible protein 1*
LPS: lipopolisacárido
Lu.: *Lutzomyia*
LUVs: vesículas unilaminares
MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz
MGF: Formato genérico Mascot
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
MLVs: vesículas multilaminares
MPL-SE: monofosforil lípido A de *Salmonella Minnesota* - emulsión estable
MS: receptor de manosa
MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NH: nucleósido hidrolasa
NK: *natural killer*
NNN: medio de Novy, McNeal, Nicolle

NO: óxido nítrico
ns: no significativo
NTA: *nanoparticle tracking analysis*
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógeno
pb: pares de bases
PBS: *buffer* fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pI: punto isoeléctrico
pI/Mw: punto isoeléctrico/peso molecular
PM: peso molecular
Poly (I:C): ácido poli-inosínico:poli-citidílico
PRR: receptores de reconocimiento de patrón
PZ: potencial Z
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rLOxy: proteína recombinante LOxy
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
s.c.: subcutánea
SD: desviación estándar
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM: error estándar de la media
SFB: suero fetal bovino
SMT: esteroles 24-c-metiltransferasa
STP: *step*
T.: *Trypanosoma*
TCA: ácido tricloroacético
TCR: receptores de linfocitos T
Th: T helper
TLR: receptor tipo Toll
TMB: tetrametil bencidina
TNE: *buffer* Tris-HCl-NaCl-EDTA
TNF: factor de necrosis tumoral
TOF: tiempo de vuelo
Treg: T regulador
TSA: *thiol-specific antioxidant*
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UNCuyo: Universidad Nacional de Cuyo
wt: *wild type*



RESUMEN

RESUMEN

Introducción: La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por la infección con protozoos del género *Leishmania*. Dependiendo de la especie involucrada, esta enfermedad puede manifestarse de diferentes formas, presentándose como leishmaniosis cutánea, mucocutánea o visceral. Actualmente no existen vacunas contra esta parasitosis para su uso en humanos y el tratamiento muchas veces es ineficiente. **Al mismo tiempo, si bien existen vacunas para su uso canino, ninguna es producida en nuestro país.**

Objetivo: El objetivo general del proyecto fue desarrollar y optimizar nuevas formulaciones vacunales de primera y tercera generación contra la infección experimental por *L. amazonensis* y/o *L. infantum* en un modelo murino. Mediante estas formulaciones se buscó inducir una respuesta inmune humoral y celular protectora. Adicionalmente, se propuso identificar antígenos inmunodominantes en vacunas de primera generación que logren inducir una respuesta protectora.

Metodología: Los ATL se obtuvieron empleando 4 metodologías diferentes: autoclavado (ATLa), congelamiento/descongelamiento (ATLf), pasteurizado (ATLp) y sonicado (ATLs). Posteriormente, se analizó el perfil proteico de cada ATL mediante SDS-PAGE, y se comparó la respuesta inmune humoral y celular generada por la inmunización con los ATL en ratones BALB/c sin el uso de adyuvantes. Adicionalmente, se analizó la respuesta inmune y protección conferida por ATLs formulado con Poly (I:C), como así también, ATLf y ATLs combinado con Poly (I:C) y Montanide ISA 763, frente a la infección experimental por *L. amazonensis* en ratones BALB/c. Con el fin de identificar los antígenos inmunodominantes en vacunas de primera generación que mostraron una respuesta inmune protectora, se llevaron a cabo técnicas de inmunoproteómica mediante *western blot* en 2 dimensiones. Para ello, membranas con los ATL separados según su punto isoeléctrico y peso molecular fueron incubados con sueros de ratones inmunizados con ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763. Las proteínas reconocidas por tales sueros fueron identificadas por espectrometría de masas. En cuanto a las vacunas de tercera generación, se obtuvo la proteína recombinante rLOxy de *L. infantum*, y la misma fue formulada con liposomas catiónicos (LC) sólo o en combinación con Poly (I:C); se analizaron ciertas características físicas de tales formulaciones, como tamaño, potencial Z, índice de polidispersión (IP), mediante las técnicas de análisis de dispersión de la luz dinámica y análisis del seguimiento de nanopartículas, así como la tasa de encapsulación de proteínas. Se evaluó la respuesta inmune humoral y protección contra el desafío experimental con *L. amazonensis* y *L. infantum* dadas por la inmunización con dichas formulaciones vacunales utilizando ratones BALB/c como modelo experimental.

Resultados: Al comparar el perfil proteico y la respuesta inmune generada por cada una de las formas de obtención de antígenos, se observó que los ATLs y ATLf presentaron una mayor conservación del perfil proteico. Los ATLs sin estar formulados con adyuvantes generaron una elevada respuesta inmune humoral y celular con un sesgo hacia el perfil Th1, caracterizado por un incremento en el índice de proliferación celular, elevados niveles de IFN- γ (19,4 ng) y bajos de IL-4 e IL-10 (0,033 ng y 1,5 ng, respectivamente). Al formular los ATLs con Poly (I:C) se observó un incremento de la respuesta inmune, con una mejoría del perfil Th1 y un aumento en la proliferación celular en ensayos de re-estimulación *in vitro*. Esta formulación generó una mejoría

clínica frente al desafío experimental con *L. amazonensis*. Por su parte, las formulaciones ATLf y ATLS combinados con Poly (I:C) + Montanide ISA 763 generaron un incremento en la respuesta inmune humoral, acompañado de una protección parcial contra *L. amazonensis*. El análisis por inmunoproteómica permitió la identificación de 4 proteínas inmunodominantes del género *Leishmania*, reconocidas por los anticuerpos séricos de animales vacunados con ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763. Finalmente, la vacuna de tercera generación formulada con rLOxy, LC y Poly (I:C) protegió contra la infección por *L. infantum* y logró reducir la manifestación clínica dada por la infección con *L. amazonensis*. La adición de Poly (I:C) a los LC formulados con rLOxy conservó ciertas propiedades físicas de los liposomas catiónicos como la tasa de encapsulación y el tamaño, mientras que generó un aumento del IP y una disminución del potencial Z, aunque manteniendo a este último con un valor positivo.

Conclusiones:

- El perfil proteico y la respuesta inmunológica generada por los ATL están sujetos a la forma de obtención de los mismos.
- Las vacunas de primera generación formuladas con ATLf o ATLS en combinación con Poly (I:C) y/o Montanide ISA 763 generan respuestas inmunológicas capaces de alcanzar una protección parcial contra la infección experimental por *L. amazonensis* en ratones BALB/c.
- Los promastigotes de *L. amazonensis* poseen varias proteínas inmunodominantes que podrían ser utilizadas como antígenos en formulaciones vacunales de tercera generación contra la leishmaniasis.
- La rLOxy formulada con liposomas catiónicos y Poly (I:C) induce una respuesta inmune protectora contra la infección por *L. infantum* y logra reducir la manifestación clínica generada por la infección con *L. amazonensis* en ratones BALB/c.
- Las formulaciones ensayadas podrían ser candidatos vacunales para su evaluación en humanos y caninos, luego de analizar su seguridad.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La inmunización con antígenos totales de *L. amazonensis* y antígenos recombinantes de *L. infantum* formulados con agonistas de TLR, emulsiones oleoacuosas y/o LC inducen una respuesta inmune protectora en ratones BALB/c capaz de controlar la infección por *L. amazonensis* y/o por *L. infantum*.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del proyecto fue desarrollar y optimizar nuevas formulaciones vacunales de primera y tercera generación contra la infección experimental por *L. amazonensis* y/o *L. infantum* en un modelo murino, mediante la inducción de una respuesta inmune humoral y celular protectora. Para esto se utilizaron antígenos totales de *L. amazonensis* (ATL) y la proteína recombinante rLOxy de *L. infantum* formulados con adyuvantes de nueva generación. Como objetivo adicional, se propuso identificar antígenos inmunodominantes en vacunas de primera generación que hayan generado una respuesta protectora.

Objetivos específicos

- 1- Producir antígenos totales de *L. amazonensis* utilizando diferentes metodologías.
- 2- Producir la proteína recombinante LOxy (rLOxy) de *L. infantum*.
- 3- Desarrollar formulaciones vacunales con la proteína recombinante encapsulada en liposomas catiónicos, combinado con Poly (I:C) como adyuvantes.
- 4a- Inmunizar ratones BALB/c, con vacunas proteicas basadas en ATL de *L. amazonensis* formuladas con los adyuvantes Montanide ISA 763 y/o con Poly (I:C) como agonista de TLR-3.
- 4b- Inmunizar ratones BALB/c con vacunas proteicas basadas en la rLOxy de *L. infantum* formulada con liposomas catiónicos, Poly (I:C) como adyuvante.
- 5- Analizar la respuesta inmune humoral y celular generada por cada formulación vacunal.
- 6- Evaluar la protección conferida por las vacunas de primera generación en ratones BALB/c, después del desafío con formas infectantes de *L. amazonensis*.
- 7- Evaluar la protección conferida por las vacunas de tercera generación en ratones BALB/c, después del desafío con formas infectantes de *L. amazonensis* y *L. infantum*.
- 8- Identificar antígenos inmunodominantes mediante técnicas de inmunoproteómica por *western blot* en 2 dimensiones.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La leishmaniosis es un conjunto de enfermedades producidas por protozoos intracelulares del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de un díptero del género *Lutzomyia* o *Phlebotomus*.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniosis es una de las seis enfermedades tropicales desatendidas (ETD) de mayor importancia, que afecta principalmente a poblaciones rurales o periurbanas de bajos recursos⁽¹⁾.

Además de la leishmaniosis existen otras 17 ETD, las cuales reúnen diferentes características⁽²⁾, entre ellas:

1. Afectan de forma desproporcionada a las poblaciones que viven en la pobreza, quienes no tienen acceso al agua potable, saneamiento y viven alejados de los centros de salud.
2. Muchas son enfermedades crónicas, de desarrollo lento, que empeoran progresivamente cuando no se diagnostican y tratan a tiempo.
3. Pueden provocar un dolor severo, ser discapacitantes y causar una importante morbilidad y mortalidad en las poblaciones afectadas.
4. Estas características dan lugar a la estigmatización y exclusión social, ocasionando problemas de salud mental.

Las condiciones mencionadas se ven agravadas aún más porque estas enfermedades son relativamente descuidadas por los sistemas económicos y políticas públicas mundiales y locales. Es decir, la asignación de recursos para el desarrollo de nuevos diagnósticos, medicamentos y otros instrumentos de control o medidas preventivas no son proporcionales a la magnitud del problema. Al mismo tiempo, la leishmaniosis y demás ETD se encuentran en expansión progresiva debido al cambio climático, la urbanización en zonas tropicales endémicas, la migración constante y la falta de apoyo económico, tratándose de un problema de salud público a nivel mundial⁽³⁾. Simultáneamente, al ser los perros el principal reservorio de la misma (además de hospederos), actúan también expandiendo la enfermedad hacia zonas urbanas y transmitiendo la enfermedad a más individuos, sin ser tenido en cuenta correctamente por las políticas de control sanitario⁽⁴⁾. Además, existe una fuerte evidencia de que los casos de leishmaniosis humana ocurren en áreas donde la tasa de prevalencia en los caninos es alta⁽⁵⁾.

Epidemiología

La leishmaniosis es endémica en 98 países tropicales y subtropicales, distribuidos en los 5 continentes. Sin embargo, el 90% de los casos se encuentran localizados en sólo 13 países: Afganistán, Argelia, Bangladesh, Etiopía, India, Irán, Sudan del Sur, Sudan, Siria, Bolivia, Brasil, Colombia y Perú. Hay aproximadamente 14 millones de personas infectadas con 310 millones de personas en riesgo de enfermar. Además, cada año se registran alrededor de 1,3 millones de casos nuevos en humanos, de los cuales 300000 corresponden a la leishmaniosis visceral y 1 millón a la cutánea o mucocutánea⁽⁶⁾.

Por otra parte, la prevalencia de la leishmaniosis canina es muy difícil de conocer con exactitud, debido a que se ve afectada por el método de diagnóstico utilizado en cada lugar, la disponibilidad de los mismos y la limitada cantidad de datos publicados⁽⁷⁾.

Esta enfermedad es endémica en países del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo (figura 1). En el continente americano en particular, se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina⁽⁸⁾.

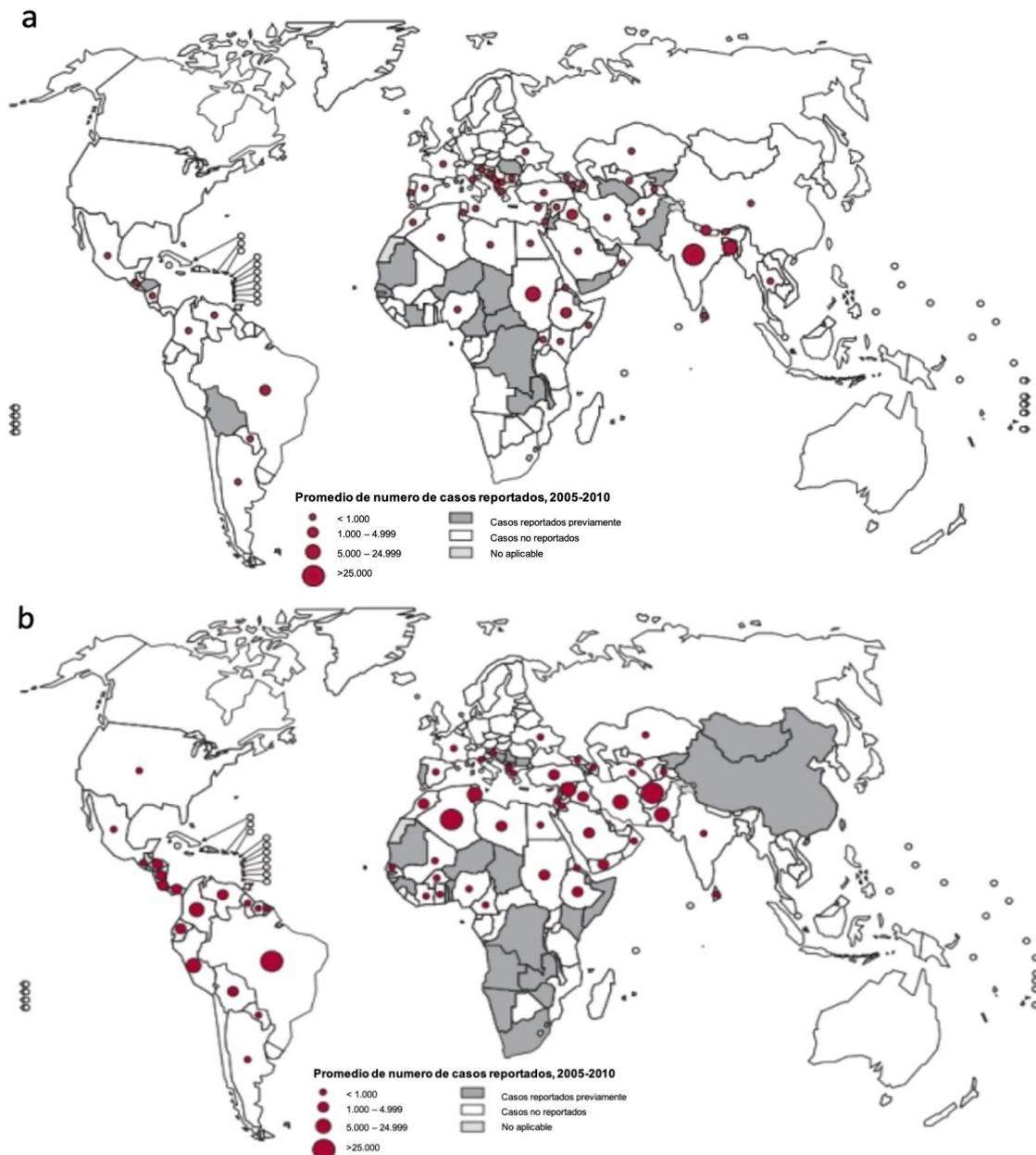


Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniosis humana visceral (a) y cutánea (b). Fuente: Modificado de *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases*⁽⁹⁾.

La leishmaniosis canina es altamente endémica de Latinoamérica, encontrándose presente en todos los países del cono sur, excepto Chile, Uruguay, Surinam y Guyana⁽⁷⁾. Diversas especies de

Leishmania han sido identificadas en caninos: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombienseis*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. pifano*⁽⁷⁾.

En nuestro país las provincias endémicas son Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Misiones y Corrientes⁽¹⁰⁾. Además, se han encontrado agentes vectores de la enfermedad en las provincias de Santa Fe, Buenos Aires, Rio Negro, Entre Ríos y Córdoba^(11, 12). En el año 2015 se registró por primera vez un caso autóctono de leishmaniosis humana en la provincia de Córdoba⁽¹³⁾ y en el 2020 en Entre Ríos (<https://www.primeraedicion.com.ar/nota/100218455/confirman-primer-caso-autoctono-de-leishmaniosis-visceral-humana-en-concordia/>). Además, se han reportado casos de las diferentes formas clínicas de esta parasitosis en provincias no endémicas debido a la migración poblacional⁽¹⁰⁾ (figura 2).

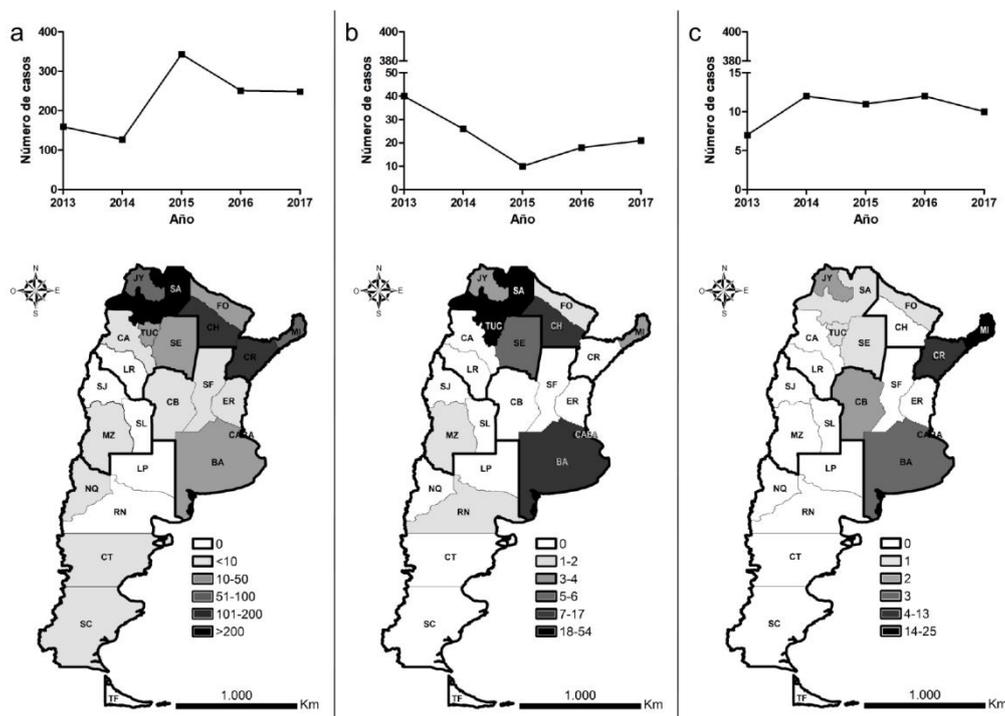


Figura 2. Distribución de la leishmaniosis humana cutánea (a), mucocutánea (b) y visceral (c) en Argentina. Los datos representan los casos confirmados de la enfermedad en cada una de las provincias desde el año 2013 al 2017. Fuente: Modificado de *Leishmaniasis in Argentine Republic: temporal and geographical distribution from 2013 to 2017*⁽¹⁰⁾.

En nuestro país, se han descrito 4 especies de *Leishmania* a partir de casos humanos y caninos: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). Las tres primeras están asociadas a la leishmaniosis cutánea y la última a leishmaniosis visceral^(11, 14). Además, *L. braziliensis* es el principal agente responsable de la leishmaniosis mucocutánea en Argentina, aunque también se ha aislado *L. amazonensis* de pacientes con esta manifestación clínica⁽¹⁵⁾.

Etiología

Agente etiológico

El género *Leishmania* fue descrito por primera vez en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright en un niño armenio. La *Leishmania* es un parásito intracelular

obligado perteneciente al reino Protista, filo Euglenozoa, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanomastidae, género *Leishmania*⁽¹⁶⁾. Este género incluye 53 especies, de las cuales 31 son parasitarias de mamíferos y cerca de 20 son patógenas para el ser humano⁽¹⁷⁾. Además de las especies que infectan al ser humano, algunas son zoonóticas, las cuales presentan una variación compleja en los hospedadores reservorios domésticos y mamíferos salvajes. Por otra parte, existen las especies antroponóticas, es decir que presentan únicamente una transmisión de humano a humano a través del vector⁽¹⁷⁾.

En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebotomos vectores: *Leishmania*, en el intestino medio o anterior, y *Viannia*, la cual se desarrolla en el intestino posterior, medio y anterior⁽¹⁸⁾.

El parásito de *Leishmania* exhibe dos formas morfológicas: el promastigote y el amastigote (figura 3). El primero está presente en el intestino del insecto vector, tiene forma alargada, es flagelado y móvil, con una longitud que oscila entre 15 a 20 μm de longitud⁽¹⁹⁾. El amastigote constituye la forma inmóvil, está carente de flagelo y es la forma intracelular del parásito, presente dentro de macrófagos y otras células del sistema fagocitario de los hospedadores mamíferos y reservorios, tiene una morfología redondeada u ovoide, con un tamaño de 3 a 5 μm y se multiplica asexualmente por fisión binaria⁽¹⁹⁾.

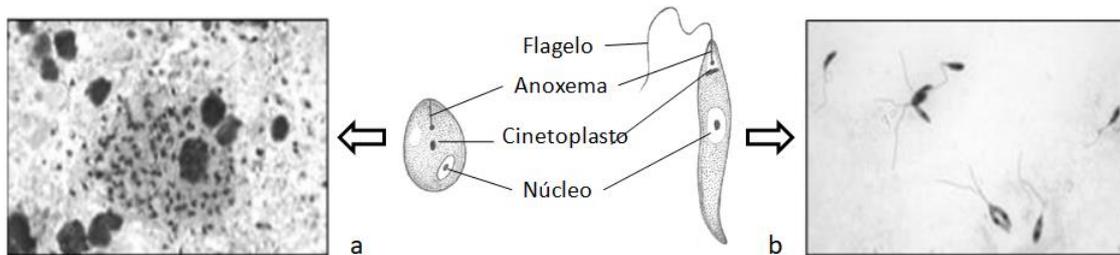


Figura 3. Morfología de los parásitos de *Leishmania* spp. Imágenes microscópicas y esquemáticas de las formas amastigote (a) y promastigote (b) de los parásitos.

Vector

La leishmaniosis es transmitida por la picadura de las hembras del insecto flebotomíneo (mosca de arena) infectadas. Se han identificado más de 600 especies del mismo, las cuales se dividen dentro de cinco géneros: *Phlebotomous* y *Sergentomyia* presentes en los países del Viejo Mundo y *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, y *Warileya* en los del Nuevo Mundo⁽²⁰⁾, aunque no todas transmiten la enfermedad al ser humano y los caninos. Estas pequeñas moscas (2-3 mm de longitud) abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano en las zonas templadas.

Varias especies de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomous* son las principales responsables de la transmisión de la leishmaniosis a humanos y caninos en el Nuevo y Viejo Mundo, respectivamente (figura 4). Cada especie de flebotomíneo transmite sólo una especie del parásito⁽¹⁾. Además, algunas especies de este vector tienen un amplio rango de hospedadores, mientras que otras sólo se alimentan del humano o de los caninos.



Figura 4. Hembra del insecto vector *Lutzomyia*. Fuente: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html.

Al igual que los demás dípteros, la metamorfosis completa de las moscas de arena comprende 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto. A diferencia de los mosquitos, los estadios inmaduros no requieren agua para su desarrollo, sino que necesitan un ambiente húmedo y cálido, presentes por ejemplo en las madrigueras de los animales, por lo que estas moscas frecuentan hábitats de roedores. Además, las mismas son susceptibles a la deshidratación, por esta razón son de hábitat nocturna⁽²¹⁾.

Hospedadores reservorios

El éxito de la transmisión de la infección por *Leishmania* involucra la presencia de reservorios diferentes al ser humano; los mismos son esenciales para mantener el ciclo de vida del parásito, ya que son la fuente de infección a partir de la cual el vector transmite la enfermedad al hombre. La mera presencia de infección en un mamífero no lo constituye un hospedador reservorio, para esto se deben dar otras características, debe existir, por ejemplo, un estrecho contacto entre el vector y el hospedador reservorio, la infección en el mismo debe ser prolongada y debe tener parásitos presentes en la piel o sangre para que puedan pasar al vector^(1, 6).

Dentro de los hospedadores reservorios se encuentran los animales domésticos, peridomésticos y silvestres, los cuales constituyen la fuente de transmisión de la leishmaniosis zoonótica. También el hombre actúa como reservorio, constituyendo la fuente de infección de la leishmaniosis antroponótica⁽¹⁾.

Muchas especies de mamíferos salvajes y domésticos han sido confirmados como hospedadores reservorios de *Leishmania* spp., dentro de los que se encuentran los caninos, felinos, roedores, armadillos, primates, zorros, entre otros⁽²²⁾.

Ciclo de vida

Las hembras del insecto vector toman los parásitos de *Leishmania* cuando pican a un reservorio infectado. Los macrófagos de la piel o circulantes, infectados con los amastigotes intracelulares, son ingurgitados por el vector hematófago favorecido por la acción del corte de la picadura.

Cuando el insecto vector ingurgita los amastigotes, los mismos sufren un proceso de metacicloogénesis pasando por diferentes estadios que varían en cuanto a su tamaño, replicación y movilidad: los amastigotes se transforman primero en promastigotes procíclicos, luego en promastigotes nectomonas, pasan por los estadios de leptomonas y haptomonas, hasta llegar finalmente a la forma infectiva de promastigotes metacíclicos⁽²³⁾. Este desarrollo ocurre en diferentes zonas del intestino, dependiendo del subgénero de *Leishmania*.

Luego de la replicación en el intestino, los promastigotes metacíclicos migran hacia el esófago y faringe. Cuando el flebotómíneo pica a un nuevo hospedador, inocula mediante un proceso de regurgitación entre 10 y 100 promastigotes metacíclicos en la piel del hospedador, junto con la saliva del mosquito, la cual presenta moléculas que favorecen la infección⁽²⁴⁾. Las células del sistema reticuloendotelial fagocitan a los parásitos, donde sufren una nueva transformación a amastigotes. Los mismos empiezan a reproducirse por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas llegando a 200 amastigotes dentro de la célula, lo que causa una disrupción de la misma, y los amastigotes liberados son captados por otros macrófagos y demás células fagocitarias mononucleares. Un nuevo insecto flebotómíneo pica al hospedador infectado tomando macrófagos que contienen los parásitos completando así el ciclo⁽²⁵⁾ (figura 5).

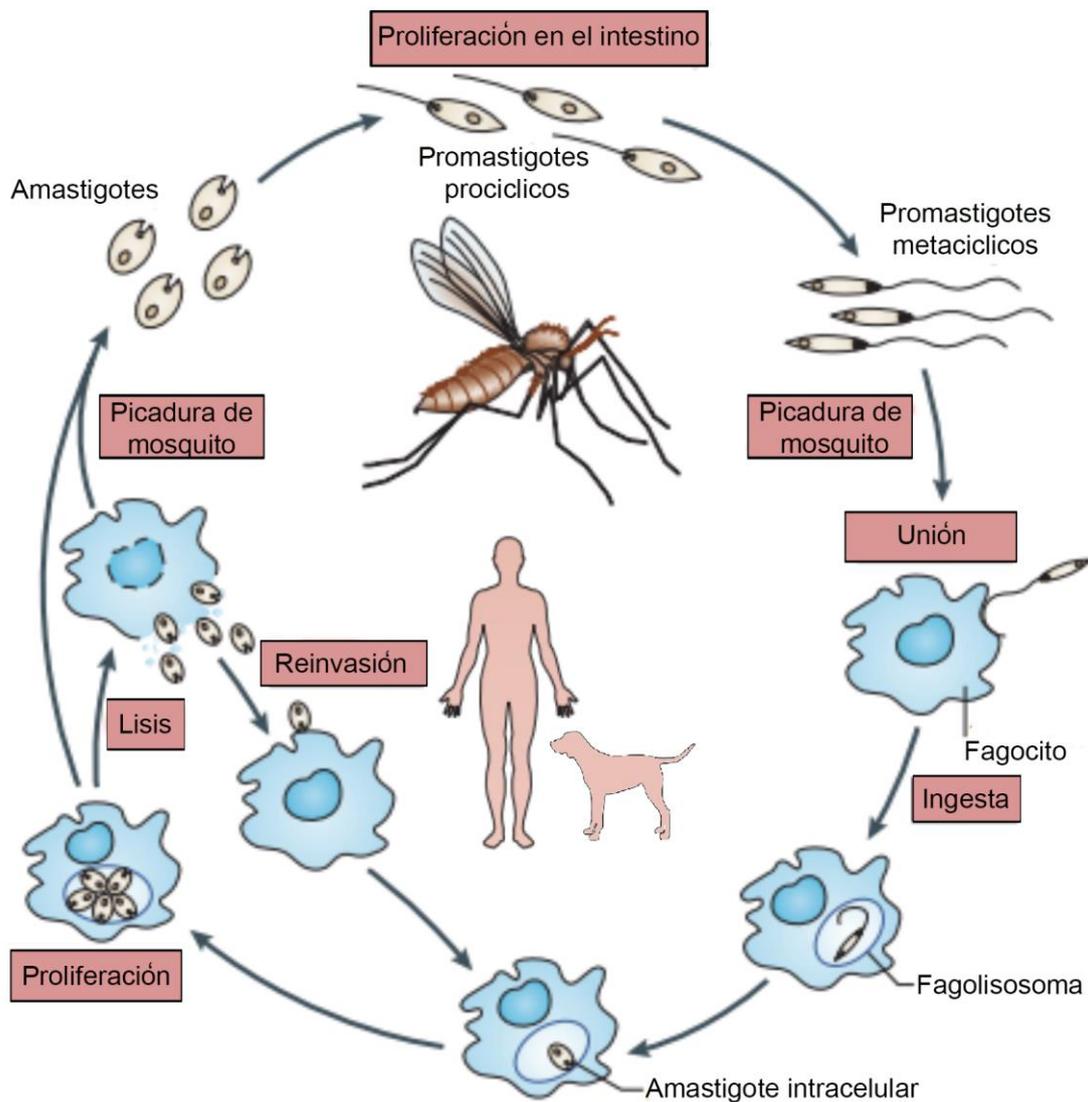


Figura 5. Ciclo biológico del parásito de *Leishmania*. Fuente: Modificado de *Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface*⁽²⁶⁾.

Formas clínicas de la leishmaniosis

En función del área geográfica de distribución, se puede diferenciar la leishmaniosis del Nuevo Mundo, presente en América, de la leishmaniosis del Viejo Mundo, en África, Asia y Europa, existiendo variaciones en las manifestaciones clínicas entre ellas⁽¹⁶⁾. Dependiendo de las formas

clínicas, esta enfermedad se clasifica en: visceral o kala-azar y cutánea, la cual puede presentarse como cutánea localizada, cutánea difusa, diseminada, *post* Kala-Azar o mucocutánea. El tipo de manifestación clínica depende de la especie de *Leishmania* involucrada y está influenciada por el *status* inmunológico, genético y nutricional del paciente⁽²⁶⁾.

Leishmaniosis visceral

Es la forma más severa y mortal de la leishmaniosis, generada por *L. infantum* (Syn.: *L. chagasi*) y transmitida en América por *Lu. longipalpis*⁽²⁷⁾. En Brasil, también es transmitida por *Lu. cruzi* y en Colombia y Venezuela además por *Lu. evansi*⁽²⁸⁾. En el Viejo Mundo, esta manifestación se produce cuando existe una infección por *L. donovani* o *L. infantum*, donde también se la denomina leishmaniosis kala-azar, debido al oscurecimiento de la piel en ciertas partes del cuerpo.

El periodo de incubación oscila entre 10 días y más de un año, y el inicio de la enfermedad suele ser gradual. En las zonas donde es endémica, la leishmaniosis visceral tiende a ser relativamente crónica y afecta especialmente a los niños. Los síntomas están caracterizados por fiebre prolongada, pérdida de peso, escalofríos, molestias en el hipocondrio izquierdo; los signos clínicos de la misma son hepato y esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia y si no es tratada puede resultar fatal⁽²⁹⁾ (figura 6).



Figura 6. Leishmaniosis visceral. El vientre del paciente se ha marcado en las zonas de agrandamiento de bazo e hígado. Fuente: Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/es/>).

Durante la leishmaniosis visceral, los parásitos infectan a los macrófagos residentes de la piel y cuando estas células liberan los amastigotes, éstos pasan a la circulación hasta alcanzar células del sistema fagocítico mononuclear presentes en hígado, bazo, médula ósea, nódulos linfoides e intestino principalmente.

Leishmaniosis cutánea

Las formas clínicas son las leishmaniosis mucocutánea y cutánea localizada, diseminada, difusa y atípica. En el Nuevo Mundo también es denominada leishmaniosis tegumentaria americana.

Las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero generalmente se originan en el punto de inoculación luego de un periodo de incubación que va de semanas a meses o incluso años. Primero se forma una mácula, seguida de una pápula que se ulcera y extiende para formar

una lesión crateriforme redondeada u ovalada típica, o bien evolucionan como lesiones nodulares. Las lesiones son generalmente indoloras y apruriginosas, aunque las infecciones secundarias con bacterias podrían complicar la herida⁽¹⁾. Las mismas pueden curarse espontáneamente de 2 a 10 meses.

Dentro de las especies involucradas en la leishmaniosis cutánea presentes en el Viejo Mundo están incluidas *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. donovani* y *L. archibaldi*. Por otro lado, en el Nuevo Mundo las principales especies son *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*.

Leishmaniosis cutánea localizada

La leishmaniosis cutánea localizada está caracterizada por una lesión con una estructura granulomatosa consistente con una marcada infiltración de células linfoides y pocos parásitos (figura 7). Las especies de *Leishmania* que generan leishmaniosis cutánea infectan a los macrófagos residentes en la piel y cuando éstos liberan los amastigotes, los macrófagos del entorno los fagocitan, quedando confinado a esta zona⁽³⁰⁾.



Figura 7. Leishmaniosis cutánea localizada. Fuente: *Leishmaniasis cutánea*⁽³¹⁾.

Leishmaniosis cutánea difusa

La forma difusa se genera por anergia linfocitaria en el hospedador con una disminuida respuesta inmune, dada por una deficiente respuesta mediada por células que permite la diseminación del parásito a otros tejidos subcutáneos, como son los casos de pacientes que sufren infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)⁽³²⁾. En el viejo mundo es producida por *L. aethiopica*, mientras que en el continente americano suele estar vinculada a *L. mexicana* y *L. amazonensis*, siendo esta última la que genera un parasitismo agresivo con la presencia de máculas, pápulas o nódulos subcutáneos con placas no ulceradas⁽³³⁾ (figura 8). Las lesiones se producen principalmente en las superficies extensoras de los miembros y en la cara, donde queda confinada a los bordes de orificios nasales y labios⁽¹⁾.



Figura 8. Leishmaniosis cutánea difusa. Fuente: *Leishmaniosis cutánea difusa en un paciente con SIDA*⁽³⁴⁾.

Leishmaniosis cutánea diseminada

La leishmaniosis cutánea diseminada presenta numerosas lesiones nodulares o ulceradas extensas, y se ha descrito en relación con infecciones por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*.

Leishmaniosis dérmica post kala-azar

La misma se manifiesta en zonas donde *L. donovani* es endémica, principalmente en Sudan e India. Suele aparecer como una complicación luego de un aparente tratamiento exitoso de la leishmaniosis visceral (o kala-azar). Se presenta como máculas eritematosas que pueden volverse pápulas o nódulos infiltrativos principalmente en la cara, aunque también puede afectar a las mucosas⁽³⁵⁾.

Leishmaniosis mucocutánea

La manifestación mucocutánea está presente principalmente en el continente americano, aunque también se han reportado casos en varios países de Europa y Asia⁽³⁶⁾. Esta manifestación se produce por una diseminación linfática o hematogena de los parásitos hacia la mucosa oral y respiratoria alta, donde se producen lesiones que causan destrucción del tejido, con desfiguración del rostro (figura 9). En Argentina, esta forma clínica se asocia con más frecuencia a la infección por *L. braziliensis*, pero puede deberse a la infección por otras especies⁽¹⁰⁾.



Figura 9. Leishmaniosis mucocutánea. Fuente: *Diagnosis of Leishmania Infection in a Non endemic Area of South America*⁽³⁷⁾.

Respuesta inmune frente a la infección por *Leishmania*

Frente a la infección por *Leishmania* se pueden generar diferentes respuestas inmunológicas que dan como resultado la resistencia o la susceptibilidad a esta enfermedad llevando a diferentes manifestaciones clínicas posibles. Esta respuesta inmune depende del estado inmunológico y factores genético del hospedador⁽³⁸⁾, como así también de la especie y cepa de *Leishmania* involucrada^(39, 40). De esta manera, pacientes infectados por diferentes cepas de una misma especie de *Leishmania* pueden presentar diferentes manifestaciones clínicas.

Rol del sistema inmune innato frente a la infección por Leishmania

Las primeras células reclutadas al inicio de la infección por *Leishmania* son los neutrófilos, convirtiéndose en las primeras células dianas donde estos parásitos residen. El rol de los neutrófilos frente a la infección por *Leishmania* aún no está totalmente esclarecido, aunque se sabe que, durante la infección por *L. amazonensis*, estas células son capaces de matar directamente a los parásitos^(41, 42). Además, los neutrófilos pueden controlar la infección mediante la interacción con macrófagos infectados, logrando la activación de los mecanismos

de muerte del parásito en estas células⁽⁴³⁾. Por otra parte, los neutrófilos liberan quimiocinas que reclutan a las células dendríticas (DC) hacia el sitio de infección de *L. major*⁽⁴⁴⁾. Las DC y los monocitos también juegan un rol fundamental en las primeras etapas de la infección. Los monocitos son diferenciados a DC derivados de monocitos y, junto con otras DC, se dirigen a los ganglios linfáticos efectuando allí la presentación antigénica y promoviendo la activación de la inmunidad adaptativa^(45, 46).

Posteriormente, los macrófagos infectados son activados por el IFN- γ , permitiendo aumentar la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), responsable de la producción de óxido nítrico (NO). Este último, junto con las demás especies reactivas de nitrógeno (RNS) derivadas del mismo y las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el estallido respiratorio causado por la infección, son responsables de la muerte del parásito^(47, 48).

Por otra parte, las células del sistema inmune innato poseen receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) que reconocen a los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) presentes en la superficie de los microorganismos⁽⁴⁹⁾. Dentro de los PRRs podemos encontrar al receptor de manosa (MR), receptores de fibronectina (FnRs), receptores tipo Toll (TLR), entre otros. Una vez que los PRRs se unen a los PAMPs, se activan cascadas de señalización intracelular que terminan en la traslocación al núcleo de factores de transcripción, los cuales inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias⁽⁵⁰⁾. Estas últimas aumentan la respuesta inmune, activan linfocitos, actúan como agentes quimiotácticos y/o inducen apoptosis de células infectadas⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Rol del sistema inmune adaptativo frente a la infección por Leishmania

Una vez que las DC presentan el antígeno a los linfocitos T vírgenes, son activadas e incrementan la producción de IL-12, lo que favorece la diferenciación de linfocitos Th0 a Th1 y al mismo tiempo inhibe la diferenciación hacia Th2^(45, 46). Por su parte, las células Th1 efectoras se dirigen al sitio de infección y, mediante la producción de IFN- γ , activan a los macrófagos infectados fortaleciendo los mecanismos microbicidas que conducen a la muerte de los parásitos⁽⁵⁴⁾.

En términos generales, la resolución de la infección primaria generada por *L. major* está mediada por linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ ⁽⁵⁴⁾. Por el contrario, la severidad de la infección parece estar dominada por dos mecanismos principales: i) un aumento de la respuesta de linfocitos Th2 mediante la producción de IL-4; ii) y la producción de IL-10 por parte de diferentes poblaciones celulares^(55, 56). Belkaid y colaboradores observaron que ratones C57BL/10 IL-10^{-/-} fueron capaces de controlar la infección por *L. major*, logrando una resolución más rápida de la tumefacción y acompañado de una disminución en la carga parasitaria que aquellos ratones *wild type* (wt)⁽⁵⁷⁾. Además, se ha demostrado que IL-10 cumple un rol similar en la susceptibilidad frente a la infección por *L. mexicana* y principalmente por *L. amazonensis* debido a que ratones BALB/c IL-10^{-/-} infectados presentaron una menor tumefacción y carga parasitaria acompañado por un incremento en los niveles de NO, IFN- γ , comparado con ratones wt⁽⁵⁸⁾.

El mecanismo por el cual IL-10 favorece la infección por *Leishmania* aún no está claro, aunque existen evidencias de que esta citoquina controla la activación de los macrófagos y disminuye la producción de IL-12 y TNF- α por parte de estas células⁽⁵⁶⁾. La IL-10 es producida por diferentes tipos de células como Treg, NK, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, macrófagos y DC cuando existe una infección por *Leishmania*⁽²⁶⁾. A pesar de esto, parece que la IL-10 promueve la persistencia

del parásito cuando es producida principalmente por linfocitos Treg⁽⁵⁹⁾, aunque macrófagos expuestos a amastigotes cubiertos de IgG también son productores de esta citoquina⁽⁵⁶⁾.

El estudio del perfil de anticuerpos generados durante la infección o por la inmunización en ratones BALB/c ha sido usado como parámetro para determinar el perfil Th1 o Th2 de la respuesta^(60, 61). Esto se debe a que las citoquinas IFN- γ e IL-4 inducen la producción de anticuerpos del isotipo IgG2a e IgG1 respectivamente en modelos murinos⁽⁶¹⁾.

La respuesta inmune frente a la infección por *Leishmania* puede verse resumida en la figura 10.

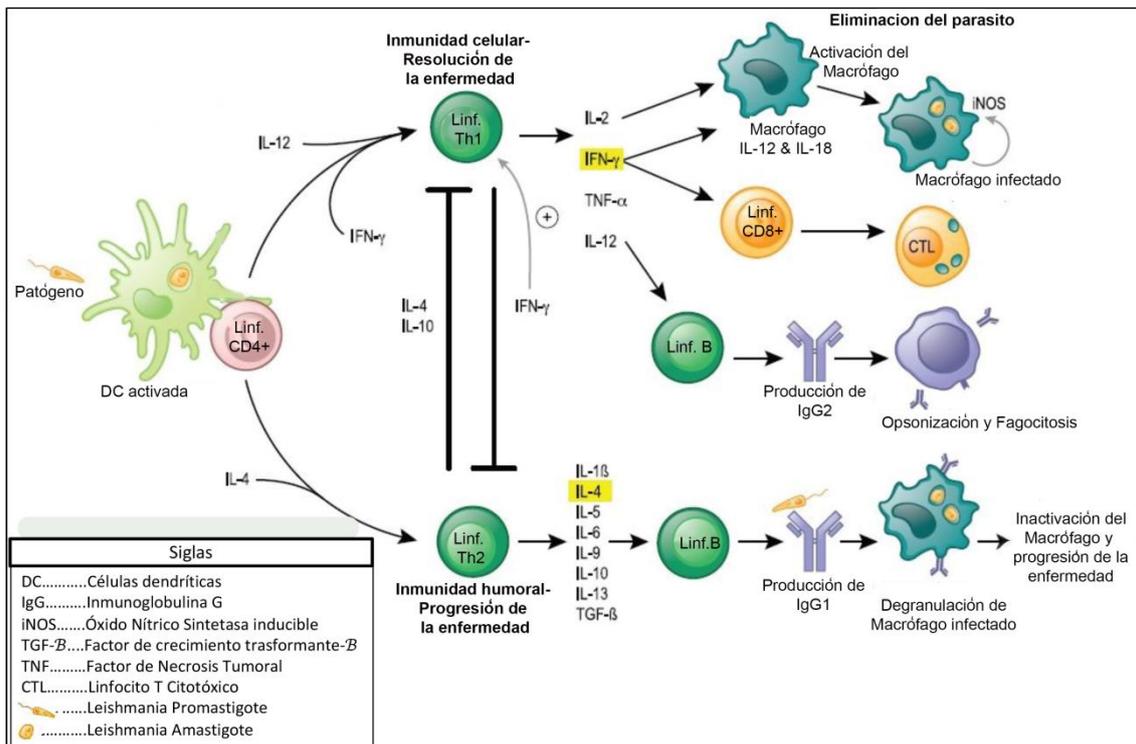


Figura 10. Respuesta inmunológica frente a la infección por *Leishmania* spp. Fuente: modificado de *Human immunodeficiency virus and leishmaniasis*⁽⁶²⁾.

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de *Leishmania*

Las diferentes especies de *Leishmania* disponen de mecanismos de evasión de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. En las primeras horas luego de la infección, tanto macrófagos como neutrófilos son reclutados al sitio de infección. Esto se debe a que el parásito estimula, en esta etapa de la infección, una respuesta pro-inflamatoria favorecida al mismo tiempo por proteínas presentes en la saliva del vector flebotomíneo, permitiéndole de esta manera evadir el sistema inmune humoral⁽⁴³⁾. Además, proteínas del parásito lo defienden de la lisis por complemento y al mismo tiempo estimulan este mecanismo para favorecer la fagocitosis⁽⁶³⁾. A pesar del ambiente ácido dentro del lumen de las vacuolas parasitóforas, los parásitos logran sobrevivir en su interior ya que son organismos acidófilos; esta adaptación está relacionada con algunas proteínas presentes en la membrana externa de los amastigotes⁽⁶⁴⁾. Adicionalmente, los parásitos de *Leishmania* son capaces de inhibir la producción de IL-12 por parte del macrófago⁽⁶⁵⁾ y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y moléculas co-estimuladoras, impidiendo la presentación de antígeno⁽⁶⁶⁾. Diferentes especies de *Leishmania* utilizan distintos mecanismos para disminuir la expresión de

IL-12 e incrementar la IL-10, lo que podría inducir anergia de linfocitos T efectores y promover la generación de Treg inducibles específicas para *Leishmania*⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Por último, los protozoos del género *Leishmania* son capaces de inhibir la expresión de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias por parte del macrófago, evitando el reclutamiento de células y activación de otros mecanismos inmunitarios contra el patógeno^(70, 71).

Tratamiento contra la leishmaniosis

A pesar de las diferentes formas clínicas presentes tanto en países del Nuevo como del Viejo Mundo y la susceptibilidad a las drogas, los tratamientos utilizados son los mismos.

Tratamiento de primera línea

Sales de antimonio pentavalente, desarrolladas en 1945, son utilizadas como drogas de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en países en vías de desarrollo⁽⁷²⁾. Las mismas se presentan como 2 formulaciones: antimoniato de meglumina (Glucantime®) y estiboglucanato de sodio (Pentostam®). El mecanismo de acción de estas sales aún no está dilucidado, aunque se sabe que estas sales inhiben la actividad de las vías oxidativas de ácidos grasos y glicólisis en los amastigotes. Estas drogas se administran vía intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intralinfática (i.l.) durante 28-30 días. Entre los efectos adversos se ha demostrado que producen severa cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad⁽⁷³⁾. La eficacia de estas sales depende de la región geográfica, la especie de *Leishmania* y la manifestación clínica⁽⁷²⁾.

Tratamiento de segunda línea

La anfotericina B es usada como droga de primera elección para el tratamiento de la leishmaniosis mucocutánea y/o visceral en algunas partes del mundo. Sin embargo, debido a su elevado costo e inestabilidad al calor, no es posible usarla en países en vías de desarrollo como tratamiento de primera línea⁽⁷²⁾.

El mecanismo de acción es inhibir la síntesis de ergosterol, presente en la membrana de *Leishmania* y algunos hongos (por lo se desarrolló primero como antifúngico); de esta manera, incrementa la permeabilidad de la membrana de promastigotes y amastigotes, provocando la muerte del parásito⁽⁷⁴⁾. Se ha demostrado la eficacia contra la leishmaniosis visceral y mucocutánea⁽⁷²⁾. A partir de la anfotericina B deoziclorato, se han desarrollado diferentes formulaciones para mejorar la biodisponibilidad, la farmacocinética y reducir los efectos adversos: anfotericina B liposomal (AmBisome®), como dispersión coloidal (Amphocil™) y como complejo lipídico (Abelcet®). La anfotericina B deoziclorato se debe administrar por vía i.v. diariamente durante 15 a 20 días, en cambio la anfotericina B liposomal es de única dosis⁽⁷³⁾. Entre los efectos adversos de la anfotericina B, se encuentran la nefrotoxicidad, hipocalcemia, fiebre elevada, entre otros; por su parte la formulación liposomal posee efectos más leves de nefrotoxicidad^(75, 76).

Control de la leishmaniosis canina

El uso de insecticidas tópicos es la principal forma para evitar la infección por *Leishmania* en los caninos. Al mismo tiempo, la eutanasia de los animales seropositivos es una medida de control adoptada por la mayoría de los países endémicos. Mientras que en otros, la aplicación de

tratamiento con sales de antimonio o combinado con otras drogas como miltefosina sugiere otra posibilidad para el control de esta enfermedad⁽⁷⁷⁾. Sin embargo, debido a que estas drogas no siempre alcanzan la eliminación completa del parásito en hospedero, estos animales domésticos se vuelven asintomáticos, pero podrían continuar con la transmisión de la enfermedad a otros reservorios y al ser humano.

Vacunas contra la leishmaniosis

Hasta el momento no existen vacunas contra la leishmaniosis humana⁽⁷⁸⁾. Por otra parte, las vacunas contra la leishmaniosis canina no han sido desarrolladas ni evaluadas en la República Argentina, lo que podría implicar un cambio en la eficacia de las mismas debido a la diferencia en las especies de *Leishmania* presentes en nuestro país respecto a otros^(39, 40). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales podría ser una estrategia preventiva, que a su vez evitaría los efectos adversos de los tratamientos actuales.

Una vacuna eficiente contra la leishmaniosis debería generar una respuesta inmune celular caracterizada por un aumento en la proliferación celular *in vivo* e *in vitro* con perfil Th1, es decir un incremento en la producción de IFN- γ y de anticuerpos antígeno-específicos del isotipo IgG1 e IgG3 en el caso de humanos, lo que correspondería a los isotipos IgG2a para un modelo murino o IgG2 para caninos. Además, una baja producción de IL-4, IL-10 y anticuerpos del isotipo IgG4 (en humanos) o IgG1 (en modelo murino y canino) podrían favorecer a la respuesta Th1. Por otra parte, esta respuesta debería generar memoria inmunológica, es decir lograr protección contra la infección meses e incluso años después de la inoculación.

Clasificación de las vacunas

De acuerdo a la forma de obtención de los antígenos, las vacunas pueden clasificarse en aquellas de primera, segunda y tercera generación. Los antígenos de primera generación son los obtenidos mediante la inactivación o muerte del organismo; por otra parte, los antígenos de segunda generación son aquellas proteínas y/o componentes químicos purificados directamente desde el parásito; y por último, las vacunas de tercera generación son las producidas mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante⁽⁷⁹⁾.

El uso de vacunas de primera generación tiene las ventajas de presentar todos los antígenos, por lo que son altamente inmunogénicas, sin embargo, no necesariamente inducen protección por sí solas. Por otra parte, podrían no ser tan seguras debido a la reactivación del microorganismo o toxicidad a causa de la presencia de componentes desconocidos.

Por el contrario, la producción de vacunas de tercera generación implica un elevado costo de producción, además son poco inmunogénicas y en algunos casos inestables (principalmente aquellas compuestas por péptidos, debido a la acción de las proteasas). Este tipo de vacunas requiere el uso de adyuvantes que muchas veces pueden ser tóxicos. Sin embargo, este tipo de vacunas suelen ser más seguras, su proceso puede ser estandarizado y su composición es bien conocida⁽⁸⁰⁾.

Proteína LOxy como antígeno vacunal de tercera generación

Una de las proteínas de *Leishmania* candidata a ser utilizada en vacunas podría ser la LOxy o LiHyp1. La proteína hipotética LiHyp1 (Código de acceso: XP_001468941.1) ha sido identificada mediante ensayos de inmunoproteómica a partir de amastigotes de *L. infantum*, siendo

reconocida por sueros de canes infectados tanto sintomáticos como asintomáticos⁽⁸¹⁾. La misma es una proteína hipotética perteneciente a la superfamilia de las oxigenasas dependiente de 2-oxoglutarato y de hierro⁽⁸²⁾.

La LOxy obtenida de forma recombinante ha sido evaluada en vacunas, tanto sola como en forma de poliproteína con otras 2 proteínas de *L. infantum*, formulada con saponina en un modelo murino. Las vacunas formuladas con LOxy incrementaron la respuesta inmunológica del tipo Th1 tanto humoral como celular, caracterizada por un aumento de anticuerpos IgG2a, y citoquinas IFN- γ , GM-CSF e IL-12 con bajos niveles de IgG1, IL-4 e IL-10; esta respuesta se vio potenciada cuando la formulación vacunal estaba compuesta por las 3 proteínas^(82, 83). Al mismo tiempo, tanto la LOxy en forma de monoproteína como la vacuna de poliproteínas combinadas con saponina, presentaron protección frente a la infección por *L. infantum*^(82, 83). Por otra parte, esta proteína ha sido evaluada contra la infección experimental por *L. donovani* en modelos murinos combinada con CpG y liposomas catiónicos inoculada por vía subcutánea (s.c.), así como formulada con CpG e inoculada mediante parches de microagujas solubles, generando elevada inmunogenicidad y protección frente a la infección⁽⁸⁴⁾.

Adyuvantes

Características generales

Los adyuvantes son sustancias exógenas de composición diversa que permiten potenciar y dirigir la inmunogenicidad de los antígenos, permitiendo una respuesta inmune protectora fuerte y de larga duración contra la infección, además de reducir la dosis de antígeno necesaria⁽⁸⁵⁾.

De acuerdo al mecanismo de acción, los adyuvantes pueden clasificarse en sistema de *delivery* o inmunoestimulantes⁽⁸⁶⁾.

Dentro de los sistemas de *delivery*, se pueden encontrar a los adyuvantes particulados, las emulsiones como Alim, agua en aceite o aceite en agua, los liposomas, partículas del tipo virales (*virus-like particles*), entre otros. Algunos sistemas de *delivery*, como las emulsiones, generan un depósito ("*depot*") de antígeno en el sitio de inoculación que permiten liberarlo gradualmente, lo cual mejora la presentación antigénica del mismo por parte de las células presentadoras de antígeno (APC)⁽⁸⁶⁾. Por otra parte, los liposomas permiten transportar la formulación vacunal a los nódulos linfoides a través del sistema linfático, además de proteger a las proteínas presentes en su interior⁽⁸⁰⁾. Este tipo de adyuvantes puede optimarse adicionando en su estructura, péptidos dirigidos hacia receptores presentes en células dendríticas u otras APC.

Por el contrario, los adyuvantes inmunoestimulantes se caracterizan por tener un efecto directo en la activación y función inmune celular⁽⁸⁶⁾. Entre ellos, podemos encontrar a agonistas de TLR y otros PRR que, al unirse a éstos, activan una cascada de señalización intracelular que finaliza en: i) la expresión de citoquinas y otros moduladores inmunológicos; ii) el incremento de los niveles de los MCH I y II en la superficie celular de las APC y de los receptores de linfocitos T (TCR); iii) maduración de las APC, mediante el incremento de moléculas co-estimuladoras; iv) diferenciación de linfocitos T; v) reclutamiento de células inmunes y migración a los nódulos linfoides. Todos estos mecanismos permiten incrementar la respuesta frente al antígeno⁽⁸⁷⁾. Entre los agonistas de TLR aprobados para su uso en humanos, se encuentran el monofosforil lípido A (MLP) y el oligonucleótido (ODN) CpG⁽⁸⁸⁾. El MPL es un derivado del LPS presente en las

bacterias Gram negativas, por lo que es un agonista del TLR-4; mientras que el CpG actúa como agonista del TLR-9.

Montanide ISA 763

Los adyuvantes basados en Montanide han sido usados en vacunas humanas y veterinarias^(89, 90). Los mismos consisten en aceites minerales que generan un *depot* en el sitio de inoculación, lo que permite la liberación gradual del antígeno, prolongando la respuesta inmune y favoreciendo la fagocitosis. Al mismo tiempo, el antígeno es protegido de la degradación⁽⁹¹⁾.

Liposomas catiónicos (LC)

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por fosfolípidos anfipáticos que permiten incorporar tanto antígenos como adyuvantes inmunoestimulantes, protegiéndolos de la degradación. Al mismo tiempo, los LC permiten dirigir a los antígenos y adyuvantes hacia las APC, quienes los incorporan por endocitosis⁽⁹¹⁾.

La composición, carga y tamaño de los liposomas, entre otros parámetros, influyen en la respuesta inmune dada por los mismos. Así, los liposomas con carga positiva son captados de manera más eficiente por las APC que los negativos o neutros. Por otra parte, los LC con un tamaño de unos pocos cientos de nanómetros (nm) quedan atrapados en el espacio intersticial por mayor tiempo o transportados por las DC, mientras que los de menor tamaño son rápidamente liberados al torrente sanguíneo⁽⁹²⁾.

Entre las ventajas claves de los LC para el desarrollo de vacunas, se encuentran la seguridad y biodegradabilidad debido a su similitud con los componentes de la membrana celular⁽⁹³⁾.

Ácido Poli-inosínico poli-citidílico [Poly (I:C)]

El Poly (I:C) es una molécula de ARN doble cadena, agonista del TLR-3 presente en células dendríticas mieloides (mDC) y macrófagos derivados de monocitos. Al unirse al TLR-3, el Poly (I:C) estimula la producción de IFN y citoquinas proinflamatorias, favorece la presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺ y el incremento de MHC clase I, actuando como un adyuvante inmunoestimulante⁽⁸⁶⁾. A pesar de ser un buen estimulante de la respuesta inmune innata y adaptativa, este adyuvante es poco estable debido a que es fácilmente degradado por las nucleasas del suero, y el incremento de la dosis podría tener efectos adversos⁽⁹⁴⁾. Es por esto que, una buena estrategia podría ser utilizarlo en combinación con otros adyuvantes que posean efecto *depot* o *delivery* que lo proteja de la degradación, como son el Montanide y los liposomas catiónicos⁽⁹²⁾.

Avances en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis humana

Desde principios del siglo XX, existen reportes sobre individuos de zonas endémicas que han desarrollado leishmaniosis cutánea y que generan inmunidad contra la leishmaniosis una vez que se recuperan de la enfermedad. Basados en este conocimiento, se comenzó a emplear el procedimiento de la "leishmanización", el mismo consiste en la inoculación de una pequeña dosis infectiva de parásitos obtenidos desde la lesión de pacientes con leishmaniosis cutánea⁽⁹⁵⁾. A pesar de la eficiencia que presentó este método, el mismo fue interrumpido por la falta de seguridad generada en los individuos vacunados⁽⁹⁶⁾.

La demostración de que la inoculación de los parásitos de *Leishmania* induce inmunidad dio lugar al comienzo del desarrollo de vacunas utilizando estos microorganismos inactivados o muertos, es decir vacunas de primera generación.

De esta manera, una de las vacunas de primera generación que llegó a ensayos clínicos fue evaluada en individuos sanos evaluados en una población de alto riesgo en Ecuador. La misma consistió en una formulación de 3 especies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis*) muertas por fenol combinadas con bacillus de Calmette-Guerin (BCG) como adyuvante. Los resultados de este ensayo mostraron que la vacuna fue segura, generó una marcada respuesta inmune e indujo protección contra la leishmaniosis⁽⁹⁷⁾.

Por el contrario, Mayrink y colaboradores realizaron 2 ensayos clínicos esta vacuna (con algunas modificaciones en su composición) en voluntarios de la armada brasilera expuestos a la infección por 1 año durante su entrenamiento en el Amazonas brasilero⁽⁹⁸⁾. Los resultados mostraron diferente tasa de éxito, demostrando que aquellos individuos que generaron una conversión del *test* de Montenegro presentaron protección contra la infección, aunque con una baja eficacia⁽⁹⁸⁾. Biobras®, una compañía brasilera, desarrolló una forma más simplificada de esta vacuna, utilizando una sola cepa de *L. amazonensis* y posteriormente, se efectuaron ensayos clínicos de fase I-II para demostrar su inmunogenicidad y seguridad. En este ensayo se demostró que la inoculación de la vacuna no generó efectos adversos significativos a nivel local ni sistémico. Por otra parte, se observó un incremento en la induración en el *test* de Montenegro en el grupo vacunado y el control, sin presentar diferencia significativa entre ellos, además de una baja respuesta de anticuerpos en los diferentes grupos⁽⁹⁹⁾.

Convit y colaboradores desarrollaron una vacuna de primera generación utilizando promastigotes de *L. mexicana amazonensis* inactivados por calor formulados con BCG. Su inmunogenicidad fue evaluada en diferentes ensayos clínicos en individuos sanos y pacientes con leishmaniosis cutánea americana, demostrando que la misma induce un incremento de la respuesta inmune con un perfil Th1⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Otros ensayos fueron efectuados en pacientes con leishmaniosis cutánea americana para evaluar la seguridad y protección de la misma formulación vacunal comparado con individuos tratados con quimioterapia, demostrando similitud en la protección entre ambos grupos y menos efectos adversos en el grupo tratado con inmunoterapia que quimioterapia^(103, 104).

En Colombia, Velez y colaboradores evaluaron una vacuna formulada con promastigotes de *L. amazonensis* autoclavados formulados con BCG en ensayos clínicos aleatorizados, controlado por placebo y doble ciego. En uno de los estudios se evaluó la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna inoculada vía i.d. e i.m.⁽¹⁰⁵⁾. En este estudio sólo fueron observados efectos locales en individuos inmunizados vía i.d. con la formulación vacunal, sin alteraciones hematológicas y bioquímicas⁽¹⁰⁵⁾. Por otra parte, los individuos vacunados por vía i.m. mostraron un incremento en el *test* de Montenegro, en la proliferación de linfocitos, producción de IFN- γ , mientras que no hubo diferencia en la producción de IL-10 y anticuerpos entre los grupos vacunados y placebos⁽¹⁰⁵⁾. El mismo equipo de investigación realizó posteriormente un ensayo clínico con 2597 voluntarios sanos para evaluar la eficacia de esta formulación vacunal, donde no observaron protección por parte de la misma⁽¹⁰⁶⁾.

Investigadores iraníes evaluaron la inmunogenicidad, seguridad y eficacia de una vacuna de primera generación formulada con promastigotes de *L. major* autoclavados (ALM) combinados

con BCG y/o Aluminio, siendo la única vacuna contra la leishmaniosis humana en llegar a ensayos clínicos de fase III. A pesar de la seguridad e inmunogenicidad desarrollada por esta formulación, la eficacia de la misma no fue remarcable^(107, 108).

Otra vacuna de primera generación que ha llegado a ensayos clínicos de fase I es aquella formulada con antígenos totales de *L. major* obtenidos por autoclavado combinados con rIL-12⁽¹⁰⁹⁾. La seguridad, inmunogenicidad y eficacia fue evaluada en primates no humanos, mostrando ser segura e inductora de una respuesta inmune caracterizada por un incremento de IFN- γ , sin embargo, no presentó una elevada efectividad⁽¹¹⁰⁾.

Por otra parte, se han desarrollado y evaluado experimentalmente algunas vacunas de tercera generación contra la leishmaniosis humana. Una de ellas es la Leish-111f (también llamada Leish-F1), evaluada por investigadores del instituto estadounidense Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle, WA, USA). Esta vacuna está compuesta por 3 antígenos diferentes: LeIF de *L. braziliensis* (*Leishmania* elongation initiation factor), LmSTI1 de *L. major* (*L. major* stress-inducible protein 1) y TSA de *L. major* (Thiol-specific antioxidant); los mismos son formulados con un agonista del TLR-4: monofosforil lipido A de *Salmonella minnesota* (MPL-SE) como adyuvante. Ensayos clínicos de fase I han demostrado que la misma induce una respuesta inmune caracterizada por un incremento de IgG, IL-5 e IFN- γ en voluntarios sanos⁽¹¹¹⁾. Además, cuando la misma fue utilizada como tratamiento inmunoterapéutico combinada con sales de antimonio, indujo un incremento de IL-5, IFN- γ , IgG y de linfocitos T de memoria asociado a una mejoría clínica de los pacientes con leishmaniosis mucocutánea^(112, 113). Asimismo, se ha comprobado que esta formulación es segura y bien tolerada cuando es utilizada en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral, así como en voluntarios sanos^(111, 112, 114).

Posteriormente, IDRI desarrolló Leish-F2, la cual posee una modificación estructural de LeIF. Esta vacuna se ha estudiado en ensayos clínicos de fase I, mostrando ser segura e inmunogénica, por lo que ha pasado a estudios clínicos de fase II para analizar la eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea⁽¹¹⁵⁾.

Por otra parte, se ha evaluado la proteína Leish-F3 formulada con GLA-SE (glucopiranosil lípido A, otro agonista de TLR-4) o MPL-SE en ensayos clínicos de fase I⁽¹¹⁶⁾, mostrando ser segura, bien tolerada e inmunogénica⁽¹¹⁷⁾. El antígeno Leish-F3 es una proteína de fusión entre la nucleósido hidrolasa (NH) de *L. donovani* y la esterol-24-c-metiltransferasa (SMT) de *L. infantum*.

La vacuna de tercera generación ChAd63-KH ha sido desarrollada contra la leishmaniosis humana y evaluada en ensayos clínicos de fase II para la prevención y tratamiento de la leishmaniosis dérmica *post Kala Azar*⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. La misma está compuesta por un vector de expresión de adenovirus de simio que expresa un gen de fusión KH que codifica para 2 proteínas de *L. donovani*: KMP-11 y HASPB. Los resultados de los ensayos clínicos mostraron que esta vacuna generó una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específica contra antígenos de *Leishmania*, acompañado de una activación de células dendríticas y un incremento en la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺⁽¹²¹⁾.

En la Tabla 1 se resumen los datos de los estudios clínicos efectuados con las vacunas contra la leishmaniosis humana

Tabla 1. Comparación de los ensayos clínicos efectuados con vacunas contra la leishmaniosis humana

Formulación vacunal	Régimen de vacunación	Nro voluntarios	Grupos (n)	Forma de administración	Resultados	Referencia
<i>L. mexicana</i> autoclavado + BCG	3 dosis cada 6-8 semanas	94 con leishmaniosis cutánea americana	2 grupos: quimioterapia (n=42); vacunado (n=52).	Terapéutica	Seguridad: menor efectos adversos en grupo tratado por inmunoterapia que quimioterapia. Efectividad: similar entre los grupos.	(103)
<i>L. mexicana</i> autoclavado + BCG	3 dosis cada 6-8 semanas	122 con leishmaniosis cutánea americana	4 grupos: quimioterapia (n=34); vacunado (n=39); control (BCG, n=14); control (placebo: PBS, n=35)	Terapéutica	Inmunogenicidad: No hubo incremento de linfoproliferación, población celular [CD4, CD8, IL-2R (CD25)], ni positividad del test de Montenegro.	(101)
<i>L. mexicana amazonensis</i> autoclavado + BCG	3 dosis cada 6-10 semanas	208 individuos sanos	4 grupos: control (PBS, n=46); vacunado (antígeno + BCG, n=68); control (BCG, n=47); control (antígeno, n=47).	Profiláctica	Inmunogenicidad: Incremento de IFN- γ , proliferación linfocitaria, positividad del test de Montenegro.	(100)
<i>L. mexicana amazonensis</i> autoclavado + BCG	3 dosis cada 6-8 semanas	217 pacientes con leishmaniosis cutánea americana	3 grupos: control (BCG, n=42); vacunado (n=124); quimioterapia (n=51)	Terapéutica	Seguridad: El tratamiento inmunoterapéutico fue más seguro que la quimioterapia. Inmunogenicidad: No hubo incremento significativo en el test de Montenegro. Eficacia: Inmunoterapia no fue más efectiva.	(104)
<i>L. amazonensis</i> autoclavado + BCG	2-6 dosis cada 6-8 semanas	42 pacientes con leishmaniosis cutánea americana	3 grupos: quimioterapia + inmunoterapia (n=11); inmunoterapia (n=13); sin tratamiento (n=18).	Terapéutica o combinada con quimioterapia	Inmunogenicidad: Incremento de la respuesta Th1: aumento proliferación linfocitaria y de IFN- γ y sin incremento de IL-5 principalmente en los que recibieron el tratamiento combinado.	(102)
5 stocks de <i>Leishmania</i> muertos por mertiolate	3 dosis cada 1 semana	1588 voluntarios sanos	2 grupos: vacunados (n=974); control (no vacunados, n=614).	Profiláctica	Inmunogenicidad: Test de Montenegro y de sensibilidad de linfocitos positivo hasta 3 años después de la vacunación, sin incremento de anticuerpos.	(122)
5 stocks de <i>Leishmania</i> muertos por mertiolate	2 dosis cada 1 semana	1312 voluntarios sanos en zona	2 grupos: vacunados (n=667); control (PBS + mertiolate, n=645).	Profiláctica	Correlación de la protección y la positividad en el test de Montenegro.	(98)

		endémica de Brasil				
5 stocks de <i>Leishmania</i> muertos por mertiolate	2 dosis cada 1 semana	1274 voluntarios sanos en zona endémica de Brasil	2 grupos: vacunados (n=658); control (PBS + mertiolate, n=616).	Profiláctica	Test de Montenegro positivo, pero sin diferencia significativa en la protección entre grupo vacunado y el control	(98)
<i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> muertos por fenol + BCG	2 dosis cada 1 semana	844 voluntarios sanos en zona endémica de Ecuador	2 grupos: vacunados (n=438); control (BCG, n=406).	Profiláctica	Seguridad: No se observaron efectos adversos serios en ninguno de los grupos. Inmunogenicidad: Mayor positividad en la reacción de Montenegro en el grupo vacunado. Eficacia: 72,9% calculado a partir de casos confirmados de leishmaniosis cutánea.	(97)
<i>L. major</i> autoclavados + BCG	1 dosis	3637 niños sanos	2 grupos: vacunados (n=1839); control (BCG, n=1798).	Profiláctica	Seguridad: mayores efectos adversos en grupo control, aunque más persistentes en vacunados. Inmunogenicidad: mayor positividad del test de Montenegro en los vacunados. Eficacia: No hubo diferencia entre los grupos.	(108)
<i>L. major</i> autoclavados + BCG	1 dosis	2453 voluntarios sanos	2 grupos: vacunados (n=1188); control (BCG, n=1122).	Profiláctica	Seguridad: Efectos adversos locales leves fueron observados en ambos grupos, aunque más persistentes en el vacunado. Inmunogenicidad: Hubo mayor respuesta al test de Montenegro en vacunados que control hasta 1 año después de la vacunación Eficacia: No se alcanzaron buenos resultados.	(107)
Leish-F1	3 dosis cada 4 semanas	36 voluntarios sanos con y sin antecedentes de leishmaniosis	3 grupos: misma vacuna, diferentes dosis (n=12 en cada grupo).	Profiláctica o terapéutica	Seguridad: se observaron algunos efectos adversos moderados. Inmunogenicidad: Incremento de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, baja producción de IL-4, IL-10 comparado con el día previo a la inoculación.	(111)
Leish-F1 combinada con quimioterapia	3 dosis cada 4 semanas		2 grupos: vacunados + quimioterapia (n=36);	Terapéutica	Seguridad: Se observaron efectos adversos en todos los individuos.	(112)

(estibogluconato de sodio)			control (PBS) + quimioterapia (n=12)		48 voluntarios con leishmaniosis mucosa		Inmunogenicidad: Incremento de IgG, IL-5, e IFN- γ luego de la re-estimulación. Incremento de células T CD4+ de memoria productoras de IFN- γ , IL-2, TNF- α , así como linfocitos T CD4+ productores de IL-2 en voluntarios que recibieron la vacuna. Ambos grupos respondieron positivamente al test de Montenegro, aunque en mayor medida el grupo vacunado.	
Leish-F1 combinada con quimioterapia (antimoniato de meglumina)	3 dosis cada 4 semanas	44 voluntarios con leishmaniosis cutánea	3 grupos: vacunados + quimioterapia (n=27); control (MPL-SE + quimioterapia, n=8); control (PBS) + quimioterapia (n=9).	Terapéutica			Seguridad: Efectos adversos locales principalmente en los individuos vacunados y quienes recibieron el adyuvante. Inmunogenicidad: Incremento de anticuerpos en individuos vacunados. Evolución clínica: Todos los individuos fueron curados, pero el tiempo fue menor en los individuos vacunados.	(114)
Leish-F2	3 dosis cada 2 o 4 semanas	45 voluntarios con leishmaniosis cutánea	3 grupos: vacunado cada 4 semanas(n=14); vacunados cada 2 semanas (n=10); tratados con quimioterapia (estibogluconato de sodio, n=10).	Terapéutica			Seguridad: efectos adversos locales en los grupos vacunados y sistémicos en el grupo tratado con quimioterapia. Eficacia: No hubo protección.	(115)
Leish-F3 + GLA-SE	3 dosis cada 4 semanas	36 voluntarios sanos	3 grupos: vacunado (Leish-F3 + 2 μ g GLA-SE, n=12); vacunado (Leish-F3 + 5 μ g GLA-SE, n=12); control (antígeno Leish-F3, n=12).	Profiláctica			Seguridad: no se observaron efectos adversos graves local ni sistémico, solo mayor casos de fatiga en individuos que recibieron las vacunas completas. Inmunogenicidad: incremento de anticuerpos IgG, IgG1, IgG3 (Th1). Incremento de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-5 e IL-10 en individuos que recibieron Leish-F3 + GLA-SE.	(116) (117)
ChAd63-KH	1 dosis	20 voluntarios sanos		Profiláctica			Seguridad: efectos adversos locales y sistémicos leves.	(121)

2 grupos: vacunado baja dosis (n=5); vacunado alta dosis (n=15).

Inmunogenicidad: no hubo modificación en las poblaciones celulares en individuos inoculados con bajas dosis; hubo una disminución de linfocitos T CD4+ *naïve* y de memoria, así como un incremento de DC y monocitos en los individuos que recibieron la vacuna con la dosis más alta. Incremento de linfocitos T CD8+ en todos los individuos vacunados.

A pesar de los avances efectuados en las vacunas contra la leishmaniosis humana, hasta el momento no existe ninguna que haya sido aprobada para su uso, por lo que es indispensable seguir estudiando nuevas formulaciones vacunales para tal fin.

Vacunas comerciales contra la leishmaniosis canina

Actualmente existen 3 vacunas licenciadas contra la leishmaniosis visceral canina⁽¹²³⁾, sin embargo, ninguna ha sido desarrollada y evaluada en la República Argentina. Además, hay gran evidencia de la diferencia en la distribución geográfica de las diferentes especies de *Leishmania* y la respuesta inmune generada por la infección de las mismas^(39, 40). Es por esto que es necesario seguir desarrollando nuevas formulaciones vacunales para su uso en caninos.

Una de las vacunas comerciales contra la leishmaniosis canina es la formulación vacunal de tercera generación Leish-Tec[®], licenciada en Brasil y compuesta por la proteína A2 de *L. infantum* y saponina como adyuvante. La misma ha tenido una elevada eficacia (80,6%) y ha mostrado ser segura en ensayos de campo^(124, 125). Esta vacuna generó una respuesta inmune del perfil Th1 en los perros inmunizados, caracterizada por elevados niveles de IgG e IgG2 hasta incluso 14 meses después de la inmunización⁽¹²⁶⁾. Adicionalmente, un estudio de xenodiagnóstico demostró una reducción mayor al 46% en la transmisión a los vectores flebotomíneos desde perros inmunizados⁽¹²⁴⁾.

Otra de las vacunas de tercera generación comercial es LetiFend[®], licenciada en Europa para la prevención de la leishmaniosis visceral canina. LetiFend[®] está formulada únicamente por una proteína quimérica recombinante (Proteína Q) sin adyuvante. Ensayos de campo randomizados a gran escala han demostrado su seguridad y eficacia del 72%⁽¹²⁷⁾, con una respuesta inmune caracterizada por un incremento en los niveles de IgG2⁽¹²⁸⁾.

Por último, la vacuna de segunda generación Cani-Leish[®] fue licenciada en Europa por Virbac y está formulada con antígenos purificados del sistema excretor-secretor (LiESP) y saponina (QA-21). En ensayos clínicos efectuados en perros, la misma ha presentado una eficacia del 68% y una tasa de protección del 92% contra la infección por *L. infantum*⁽¹²⁹⁾. Además, Bongiorno y colaboradores demostraron que esta vacuna podría ser capaz de reducir la infección de flebotomíneos alimentados de perros vacunados⁽¹³⁰⁾. Esta formulación vacunal ha presentado una marcada respuesta inmune del tipo Th1 caracterizada por un incremento en los niveles de anticuerpos de isotipo IgG2, una mayor linfoproliferación antígeno-específica, y un aumento de linfocitos T productores de IFN- γ ⁽¹³¹⁾.

En la Tabla 2 se puede observar un análisis comparativo de los resultados de ensayos clínicos efectuados con las vacunas contra la leishmaniosis canina.

Tabla 2. Comparación de los ensayos clínicos efectuados con vacunas contra la leishmaniosis canina

Formulación vacunal	Régimen de vacunación	Nro de canes	Grupos (n)	Forma de administración	Resultados	Referencia
LeishTec®	3 dosis cada 21 días	20 perros	4 grupos: vacunados (n=7); vacunados + infección (n=7); control (no inmunizados) + infección (n=4); control (adyuvante) + infección (n=3).	Profiláctica	Inmunogenicidad: perros vacunados incrementaron niveles de IgG, IgG2 pero no de IgG1. Elevados niveles de IFN-γ y bajos de IL-10 antes y después del desafío en los vacunados. Eficacia: 4/7 animales vacunados fueron positivos para leishmaniosis, de los cuales 2 fueron sintomáticos. 7/7 animales de los grupos control fueron positivos para leishmaniosis y 5 de ellos presentaron síntomas.	(132)
	Infección experimental: 5×10^7 <i>L. chagasi</i>					
	3 dosis cada 21 días	140 perros	2 grupos: vacunados (n=70); control (no vacunados, n=70).	Profiláctica	Inmunogenicidad: 98% de los perros vacunados incrementaron los anticuerpos IgG anti-A2 de <i>Leishmania</i> . Títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2 fueron mayores en los vacunados.	(126)
	3 dosis cada 21 días	847 perros	2 grupos: vacunados (n=429); control (no vacunados, n=418).	Profiláctica	Eficacia: 71,4% eficacia según resultados parasitológicos. Reducción del 46,6% del xenodiagnóstico.	(124)
	Exposición natural en zona endémica de Brasil					
3 dosis cada 21 días + <i>booster</i> anual	229 perros	2 grupos: vacunados (n=151); control (no vacunados, n=78).	Profiláctica	Seguridad: leve reacción de hinchazón y dolorosa.	(125)	
Exposición natural en zona endémica de Brasil				Inmunogenicidad: incremento de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2 1 mes después de la inmunización y de IgG e IgG2 hasta 1 año después de la vacunación. Mayor nivel de IgG e IgG2 en los perros vacunados que los controles después de la infección. Eficacia: luego de 2 ciclos de transmisión hubo diferencia significativa en la incidencia de infección entre los vacunados (27%) y los no vacunados (42%).		

LetiFend®	1 o 2 dosis cada 21 días	21 perros Beagle	3 grupos: vacunados 1 dosis (n=7); vacunados 2 dosis (n=7); control (no vacunados n=7).	Profiláctica	Seguridad: se realizaron análisis clínicos, análisis hematológicos, bioquímicos y de orina, sin observar efectos adversos locales y sistémicos. Inmunogenicidad: incremento de los niveles de IgG en los grupos inmunizados desde los 15 días post-inmunización. Incremento de IgG2 en todos los grupos después del desafío. Eficacia: Signos patológicos en bazo, hígado y riñones de todos los animales control y apariencia normal en todos los vacunados. En el grupo control se observaron 1 perro asintomático, 3 oligosintomáticos y 3 sintomáticos. En el grupo vacunado con 1 dosis, 4 fueron asintomáticos y 3 oligosintomáticos. En el grupo que recibió 2 dosis 2 fueron asintomáticos, 4 oligosintomáticos y 1 sintomático. 7/7 animales control, 5/7 animales que recibieron 1 dosis y 6/7 animales que recibieron 2 dosis dieron positivo en el cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i> . Luego de la infección, mayor nivel de anticuerpos en grupo control.	(128)
	Infección experimental con 5×10^5 <i>L. infantum</i> 60 días post-prime					
	1 dosis + booster anual	549 perros	2 grupos: vacunados (n=275); control (n=274).	Profiláctica	Inmunogenicidad: incremento de anticuerpos IgG2 anti-proteína Q en el grupo vacunado hasta 28 días después de la inmunización y <i>booster</i> , con reducción de los mismos. Eficacia: 72% calculado a partir de los datos de perros con infección confirmada por PCR o citología.	(127)
	Exposición natural en zonas endémicas de España y Francia					
Cani-Leish®	3 dosis cada 21 días	20 perros Beagles	2 grupos: vacunados (n=10); control (no vacunados, n=10)	Profiláctica	Inmunogenicidad: Fuerte respuesta IgG, IgG2, niveles elevados de IFN- γ , mayor índice de proliferación, mayor expresión de iNOS y producción de NO hasta 1 año después de la vacunación. Capacidad leishmanicida <i>in vitro</i> .	(131) (133)
	3 dosis cada 21 días + <i>booster</i> anuales	27 perros	3 grupos: vacunación completa + 2 <i>boosters</i> anuales (n=6); vacunación completa + 1 <i>booster</i> anual (n=12);		Profiláctica	Seguridad: No hubo efectos locales luego de la administración. Sin alteración en la cantidad de células de la sangre ni del perfil bioquímico. Sólo leve hiperproteïnemia en el 10% de los individuos.

		vacunación completa (n=9)				
3 dosis cada 21 días	20 perros Beagles	2 grupos: vacunados (n=10); control (no vacunados, n=10)	Profiláctica	Inmunogenicidad: Vacunados generaron IgG1 e IgG2 después del desafío, mientras que en el grupo control solo IgG2. No hubo diferencias en el índice de linfoproliferación. Mayor producción de IFN- γ luego del desafío en el grupo vacunado que el control. <i>Status redox</i> (GSH/GSSG) luego del desafío fue mayor en perros vacunados que los grupos controles.	(135)	
Infección experimental 10 ^{8.5} promastigotes de <i>L. infantum</i>				Eficacia: Mayor capacidad leishmanicida in vitro en los vacunados. Se enfermó el 70% del grupo control y el 30% del grupo vacunado.		
3 dosis cada 21 días + <i>booster</i> anual	90 perros distribuidos en 2 zonas endémicas diferentes (Barcelona y Nápoles)	2 grupos: vacunados (n=46); control (no vacunados, n=44)	Profiláctica	Inmunogenicidad: todos los perros vacunados generaron anticuerpos IgG2 anti ESP y el 96% anti PSA; 89% de los vacunados desarrollaron anticuerpos IgG1 anti-ESP y 57% anti-PSA con un título menor. Eficacia: Al final del ensayo 33,3% de los perros control y 12,2% de los vacunados presentaron infección activa. El 23,1% de los perros del grupo control y el 7,3% de los vacunados fueron sintomáticos.	(129)	



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Las prácticas realizadas con animales de experimentación fueron efectuadas siguiendo las recomendaciones y normativas vigentes sobre bienestar animal reglamentadas por el *Canadian Council on Animal Care* (CCAC). Las mismas contaron con la autorización del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (FCM-UNCuyo) (CICUAL Aval N° 80/2016) (Anexo).

En todos los experimentos se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 8-10 semanas de edad. Los mismos fueron mantenidos en condiciones estándares, con barreras, temperatura y ciclo de luz controlados. El agua y la alimentación fueron provistas *ad libitum*.

Cultivo de parásitos

Se utilizaron las cepas de *L. amazonensis* MHOM/VE/84/MEL, proveniente del Instituto de Patología Experimental (IPE), Centro Científico Tecnológico (CCT), Salta, Consejo Nacional de Investigaciones científicas y Técnicas (CONICET) y la cepa de *L. infantum* MCAN/BR/2002/BH401, del Laboratorio de Biología Molecular de la Faculdade de Farmácia de la Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. La infectividad de las cepas fue mantenida mediante pasajes seriados realizados en la almohadilla plantar o intraperitoneal de ratones BALB/c.

Los parásitos obtenidos de la punción intradérmica de la almohadilla plantar derecha (APD) infectada con *L. amazonensis*, o del homogenato de bazo de ratones infectados con *L. infantum* fueron crecidos en medio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle), y RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 20% inactivado (Internegocios S.A.), estreptomycin 100 µg/mL y penicilina 100 UI/mL. Los promastigotes fueron mantenidos por 6-8 pasajes en estufa a 24-26 °C en medio RPMI 1640 suplementado.

Obtención de Antígenos Totales de *L. amazonensis* (ATL)

Los promastigotes de *L. amazonensis* fueron crecidos hasta alcanzar la fase estacionaria. Los mismos fueron centrifugados y lavados 3 veces con solución salina y contados en una cámara de Neubauer. Los antígenos fueron obtenidos por 4 metodologías diferentes: 1 ciclo de autoclavado a 121 °C por 15 min (ATLa); 5 ciclos de congelamiento a -80 °C y descongelamiento a 56 °C (ATLf), 1 ciclo de pasteurizado a 56 °C por 30 min en agitación (ATLp); y 1 ciclo de sonicado a 4 °C por 1 min a 40 W (ATLs). La concentración total de proteínas fue determinada por el ensayo del ácido bicinónico (BCA), siguiendo las instrucciones de manufactura (Thermo Scientific).

Análisis del perfil proteico de los ATL

Sesenta µg de cada ATL o $7,75 \times 10^6$ promastigotes (fresco) fueron separados y analizados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5% bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y el gel fue teñido usando Coomassie Brilliant Blue R-250.

El análisis densitométrico y la determinación del peso molecular de las bandas obtenidas en los perfiles proteicos de cada ATL fueron efectuados utilizando para ello el software Fiji⁽¹³⁶⁾.

Obtención de la proteína recombinante rLOxy de *L. infantum*

La proteína recombinante rLiHyp1 (Nro acceso: XP_001468941.1) (rLOxy) fue obtenida utilizando la tecnología del ADN recombinante. Para esto fueron utilizadas cepas C41 de la bacteria *Escherichia coli* previamente transformadas con el vector plasmídico pET21aLOxy. Este constructo fue obtenido mediante el uso del vector plasmídico comercial pET21a-GEN, el cual permite la incorporación de una cola de histidina (His) en la proteína, y un fragmento del ADN de *L. infantum* codificante para el gen LiHyp1, utilizando las enzimas de restricción HindIII and BamHI⁽⁸²⁾.

Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 µg/mL ampicilina a 37 °C con movimiento a 180 rpm hasta obtener una densidad óptica (D.O.) de 0,6 a 600 nm, que corresponde a una cantidad aproximada de 2×10^8 células/mL. Una alícuota de 1 mL del cultivo (No inducida) fue tomada y la expresión de la proteína fue efectuada con 1 mM de IPTG por 3 h. Luego de la incubación otra alícuota de 1 mL fue obtenida para confirmar la expresión (Inducida).

Con el fin de extraer la proteína recombinante, las células fueron centrifugadas a 8000 x g durante 10 min a 4 °C. El *pellet* obtenido fue resuspendido con *buffer* de lisis (fosfato de sodio 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, imidazol 40 mM, urea 8 M) y sonicado mediante 5 ciclos con pulsos de 10/10 s a una amplitud de 40%. El lisado fue ultracentrifugado a 10000 x g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante recolectado. La purificación de la proteína recombinante fue efectuada utilizando columnas Nickel-Sepharose-HisTrap™ HP (GE HealthCare Life Sciences) mediante el empleo del equipo AKTA prime plus (GE Healthcare). Posteriormente, fueron tomadas muestras tanto de las fracciones purificadas (rLOxy) como del “*Flow Throw*”.

Después de la purificación, las fracciones fueron agrupadas y dializadas en *buffer* fosfato salino (PBS pH 7, NaCl 0,14 M; KCl 3 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM) hasta 4 M de urea, con el fin de remover el exceso de esta última. Posteriormente, las fracciones fueron agrupadas y sometidas a un proceso de remoción de lipopolisacárido (LPS), utilizando las columnas de extracción EndoTrap® High-Definition Endotoxin Removal, de acuerdo a las instrucciones de manufactura (Hyglos GmbH, Germany).

La proteína rLOxy obtenida luego de la remoción del LPS fue cuantificada mediante la reacción de Lowry, utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

Análisis de las fracciones obtenidas e identificación de la proteína rLOxy

Con el fin de comprobar la calidad de la proteína obtenida, 2 µg de LOxy fueron resuspendidos en *buffer* de muestra (Tris-HCl 250 mM; SDS 10% p/v; glicerol 30% v/v; azul de bromofenol 0,02% p/v; β-mercaptoetanol 50 µL/mL; H₂O qsp, 1 mL) y desnaturalizados a 100 °C por 10 min. Las alícuotas obtenidas de los cultivos de bacterias obtenidos antes (No inducido) y 3 hs después de la incubación con IPTG (Inducido) fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 min y lavadas en PBS. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 150 µL de tampón de muestra y desnaturalizado a 100 °C durante 10 min. El *pool* de muestra de rLOxy (purificada) y 25 µL de las fracciones No inducida e Inducida fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 12,5%). El gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Por otra parte, un *western blot* fue efectuado con el fin de verificar si la proteína purificada correspondía a la rLOxy. Para esto, 2 µg de la proteína fueron sembrados en un gel SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) a 250 mA durante 2 h. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con tampón de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 0,05%) durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-Histidina (Monoclonal, GE Healthcare life Sciences) diluido 1/3000 en tampón de bloqueo. Inmediatamente, la membrana fue incubada durante 1 h y 30 min con un anticuerpo secundario anti-IgG (Millipore, Temecula) diluido 1/5000 en tampón de bloqueo. Finalmente, la membrana fue incubada con solución de revelado (Armstrong™ ECL™ Western Blotting Analysis System) y revelada en oscuridad utilizando placas radiográficas.

Obtención de liposomas catiónicos y formulaciones vacunales de tercera generación

Las formulaciones vacunales que contenían LC con rLOxy y/o Poly (I:C) fueron obtenidas utilizando la metodología de deshidratación-rehidratación de vesículas (DRV) previamente descrita^(137, 138), con algunas modificaciones. Los lípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), colesterol (CHOL) y metil-sulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) en una relación molar de 6:2,4:3 fueron solubilizados en cloroformo. La solución resultante fue colocada en un balón conectado a un rotavapor (IKA, modelo RV8, Alemania) para remover el solvente y formar un film lipídico homogéneo. Una vez evaporado el solvente, se agregó agua desionizada para obtener una concentración lipídica de 55 g/L. La hidratación fue realizada en agitación a 45 °C durante 1 h, resultando en la formación de una suspensión de vesículas multilaminares (MLVs). Los MLV fueron sometidos a 5 ciclos de congelamiento (en nitrógeno líquido) y descongelamiento (45 °C), lo que permite obtener vesículas unilaminales (LUVs). Con el fin de obtener liposomas de un tamaño homogéneo, la solución fue sometida a un proceso de extrusión (10 mL LI-PEX® Extruder, TRANSFERRA Nanosciences Inc., Canada), utilizando membranas de policarbonato con poros de 0,2 y 0,1 µm (membranas Whatman Nucleotide Track-Etched), realizando 5 ciclos de filtración a 60 °C en cada membrana.

Para obtener las formulaciones vacunales, el azúcar crioprotector trealosa fue adicionado en una relación molar 3:1 (lípidos:trealosa), con el fin de controlar el tamaño de las vesículas luego de ser liofilizadas. Posteriormente, fueron adicionados 20 µg de proteína por µmol de lípidos y el Poly (I:C) en una cantidad correspondiente a 1,8 veces la masa proteica. La formulación rLOxy + Poly (I:C) fue preparada mezclando la misma cantidad de cada componente usado en las formulaciones liposomales. De esta manera, las formulaciones obtenidas fueron las descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones obtenidas utilizando la proteína rLOxy y/o liposomas catiónicos

Formulación	LC (μmol)	rLOxy (μg)	Poly (I:C) (μg)
LC	0,5	-	-
rLOxy + Poly (I:C)	-	10	18
rLOxy + LC	0,5	10	-
rLOxy + Poly (I:C) + LC	0,5	10	18

Las soluciones fueron preparadas teniendo en cuenta un volumen final de 100 μL por ratón, alicuotadas en tubos, congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas por 24 h (Liotop L101 benchtop, São Carlos, São Paulo, Brasil) y finalmente las muestras fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Caracterización biofísica de las formulaciones

Las soluciones previamente liofilizadas fueron reconstituidas con 500 μL de agua desionizada por cada 300 μmol de lípido e incubado a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Las suspensiones fueron luego diluidas en PBS (pH 7) para lograr una concentración proteica de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas nuevamente a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, logrando establecer el equilibrio osmótico. Finalmente, las formulaciones fueron dializadas en 4 M de urea en PBS en tubos de diálisis con membranas de 3,5 kg MWCO (ReadyLyzer, Uniscience, USA) con el fin de estandarizar la concentración de urea en las formulaciones finales.

Para analizar el tamaño y potencial Z (PZ) de las partículas, 20 μl de las suspensiones liposomales fueron agregadas a 2 mL de tampón ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-il] etanosulfónico (HEPES 10 mM, pH 7,2) o NaCl 0,15 M. Las suspensiones fueron sometidas al análisis de distribución de partículas y PZ (Dynamic Light Scattering - DLS) utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), con un ángulo de 90° . Al mismo tiempo, utilizando este equipamiento distintos parámetros físicos fueron analizados: diámetro hidrodinámico de las partículas e índice de polidispersión (IP); así, partículas con $\text{IP} < 0,1$ pueden ser consideradas de tamaño monodisperso, valores de $0,1 < \text{IP} < 0,3$ corresponden a partículas con baja polidispersión y un $\text{IP} > 0,3$ indica suspensiones polidispersas.

Por otra parte, el análisis de rastreamiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) fue efectuado utilizando el equipo Nanosight® modelo LM14C (Malvern Instrument, UK). Esta técnica utiliza tanto el movimiento browniano y la dispersión de la luz de cada partícula; para esto, se utilizan longitudes de onda arbitrarias (generalmente con láser diodos que operan a 635, 532, 488 o 405 nm) que pasan a través de una superficie de vidrio que contiene una cámara donde se coloca la muestra. Las partículas dispersan esta luz, que es rastreada a largas distancias de magnitud por el objetivo de un microscopio óptico (figura 11). El microscopio está acoplado a una cámara que registra durante 60 s la difusión de cada partícula. La distancia recorrida mediante el movimiento browniano es utilizada para calcular el tamaño de las partículas y el coeficiente de difusión se utiliza para medir la intensidad y distribución del tamaño. El programa NTA 3.2 Dev Build 3.2.16 fue utilizado para realizar los análisis descriptos.

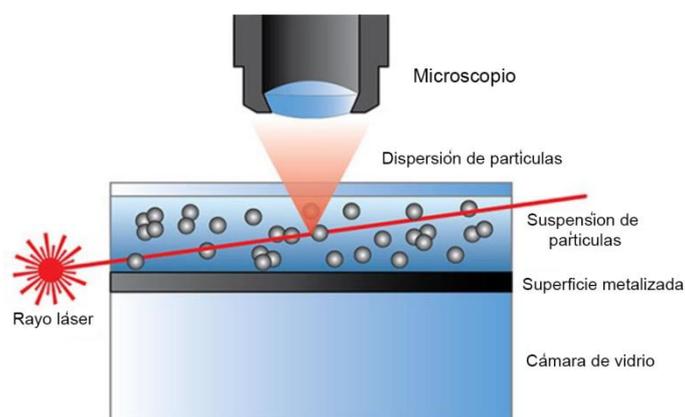


Figura 11. Esquema del funcionamiento del equipo de rastreamiento de nanopartículas (NTA). Fuente: Modificado de [https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/wilkinsk/MonDepotPublic/nanoparticle-tracking-analysis-\(nta\).html](https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/wilkinsk/MonDepotPublic/nanoparticle-tracking-analysis-(nta).html)

Determinación de tasa de encapsulación proteica

Una alícuota de liposomas que contiene proteína rLOxy fue utilizada para cuantificar el contenido total de proteínas (encapsuladas + no encapsuladas); para esto, la misma fue lisada y el contenido de proteínas liberadas fue calculado utilizando el método de Lowry⁽¹³⁹⁾, con modificaciones para dosificar también proteínas de membrana y eliminar interferentes como urea y lípidos⁽¹⁴⁰⁾. Otra alícuota de liposomas conteniendo proteínas fue utilizada para calcular la cantidad proteica en el interior; para esto, los liposomas fueron centrifugados 30 min a 5000 x g a 4 °C, separando así el contenido no encapsulado (sobrenadante). El *pellet* resultante fue lavado con PBS y tratado con un *buffer* de lisis de vesículas para calcular la cantidad de proteínas encapsuladas. Así, la tasa de encapsulación (ER) fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$ER (\%) = \frac{\text{Cantidad de proteínas dentro de vesículas}}{\text{Cantidad total de proteínas en la muestra}} \times 100$$

Esquema de vacunación para vacunas de primera generación

Protocolo Nro 1

Los animales fueron inoculados 2 veces utilizando un sistema *prime/boost* homólogo cada 21 días mediante la vía s.c. en la zona interescapular. En este protocolo fueron utilizados 5 grupos de 4 ratones cada uno (N = 20). Los grupos y la dosis utilizada por cada formulación pueden observarse en la tabla 4.

Tabla 4. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 1

Grupo	N	ATL (µg)	PBS (Hasta completar volumen final: µL/ratón)
Control	4	-	
ATLa	4	100	
ATLf	4	100	100
ATLp	4	100	
ATLs	4	100	

Veintiún días después de la segunda inmunización, la extracción de sangre desde los ratones fue efectuada con el fin de evaluar la respuesta inmune humoral. El mismo día, los animales fueron eutanasiados para evaluar la respuesta inmune celular (figura 12).

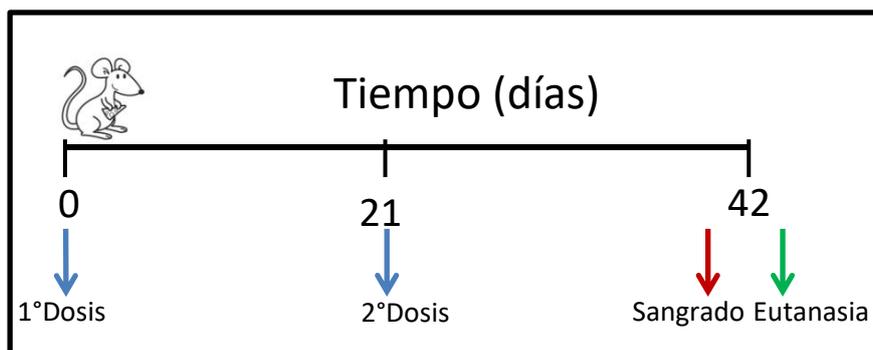


Figura 12. Esquema de inmunización correspondiente al protocolo Nro 1.

Protocolo Nro 2

Este protocolo fue realizado siguiendo el mismo esquema de inmunización que el protocolo Nro 1, empleando 3 grupos de 5 ratones cada uno ($N = 15$). Los grupos y la dosis utilizados por cada formulación pueden observarse en la tabla 5.

Tabla 5. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 2

Grupo	N	ATLs (μg)	Poly (I:C) (μg)	PBS (Hasta completar volumen final: $\mu\text{L}/\text{ratón}$)
Control	5	-	-	
ATLs	5	100	-	100
ATLs + Poly(I:C)	5	100	50	

Veintiún días después de cada inmunización, los animales fueron sometidos a extracciones de sangre para evaluar la respuesta inmune humoral generada por las inoculaciones. Veintiún días después del *boost*, los animales fueron eutanasiados con el fin de evaluar la respuesta inmune celular (figura 13).

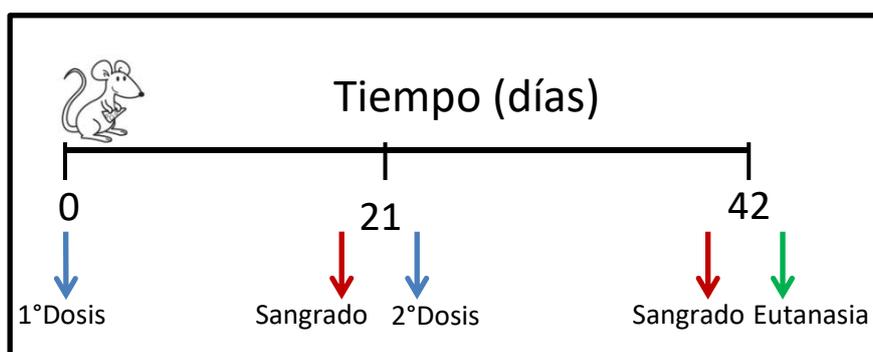


Figura 13. Esquema de inmunización correspondiente al protocolo Nro 2.

Protocolo Nro 3

El mismo fue realizado siguiendo el esquema de inmunización que el protocolo Nro 1, empleando 3 grupos de 5 ratones cada uno ($N = 15$). Los grupos y la dosis utilizada por cada formulación pueden observarse en la tabla 6.

Tabla 6. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 3

Grupo	N	ATLf (μg)	ATLs (μg)	Poly (I:C) (μg)	Montanide ISA 763 (μL)**
Control*	5	-	-	-	-
ATLf + Poly(I:C) + Montanide	5	100	-	50	140
ATLs + Poly(I:C) + Montanide	5	-	100	50	140

*Los animales del grupo control fueron inoculados con 200 μL de PBS.

**El volumen de Montanide ISA 763 utilizado se calcula en base a una relación 70:30 con el volumen acuoso, constituido por los ATL, el Poly (I:C) y el PBS.

En todos los grupos se utilizó PBS como vehículo para completar un volumen final de 200 μL .

Veintiún días después de cada inmunización, los ratones fueron sometidos a extracciones de sangre para evaluar la respuesta inmune humoral. Veintiún días después del *boost*, los animales fueron eutanasiados con el fin de evaluar la respuesta inmune celular.

Esquema de vacunación para vacunas de tercera generación

Protocolo Nro 4

Este protocolo fue realizado siguiendo el mismo esquema de inmunización que en el Nro 1, empleando 4 grupos de 5 ratones cada uno (N = 20). Los grupos y la dosis utilizados por cada formulación pueden observarse en la tabla 7.

Tabla 7. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 4

Grupo	N	rLOxy (μg)	Poly (I:C) (μg)	LC	PBS (Hasta completar volumen final: μL /ratón)
Control	5	-	-	-	
rLOxy + Poly (I:C)	5	10	18	-	100
rLOxy + LC	5	10	-	+	
rLOxy + LC + Poly (I:C)	5	10	18	+	

Veintiún días después de cada inmunización, los ratones fueron sometidos a extracciones de sangre para evaluar la respuesta inmune humoral.

Análisis de la respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral fue determinada 21 días luego de la primera y/o segunda dosis, utilizando los sueros obtenidos de las muestras de sangre de los animales inmunizados. Para esto, los niveles de anticuerpos de IgG y sus isotipos IgG1 e IgG2a anti-ATL o anti-rLOxy fueron detectados mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) del tipo indirecto.

Placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 3 μg por pocillo de ATL en 100 μL de PBS o 200 ng de rLOxy en 100 μL de tampón carbonato/bicarbonato durante toda la noche a 4 °C. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con 200 μL por pocillo de leche descremada al 5% en PBS durante 60 min a temperatura ambiente. Las placas fueron incubadas 1 h a 37 °C con sueros diluidos en leche al 5% en PBS (1/400 o 1/500 para los protocolos que involucraron el uso de vacunas de primera generación o 1/100 para el protocolo de vacunas de tercera generación). Luego, las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen) en una dilución 1/10000 en leche al 5% en PBS, o anti-IgG1 (dilución 1/2000) o anti-IgG2a de ratón (dilución 1/1000) conjugados con biotina (BD Pharmingen) durante 1 h a 37 °C. En el caso de los anticuerpos conjugados con biotina, la placa se incubó durante 1 h con la enzima estreptavidina-HRP (BD Pharmingen)

utilizando una dilución 1/1000 en leche al 5% en PBS. Entre cada etapa se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con 50 µL por pocillo de tetrametilbencidina (TMB, BD Biosciences) y la reacción se detuvo con una solución de ácido sulfúrico 2N. Finalmente, la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo Scientific). Los resultados fueron representados por la media \pm error estándar de la media (SEM) de la densidad óptica (D.O.) obtenida.

Cultivo primario de esplenocitos

El bazo de los animales sacrificados 21 días posteriores a la última inmunización de los protocolos 1, 2 y 3 fue removido y homogeneizado en medio RPMI-1640 suplementado con penicilina 100 UI/mL y estreptomycin 100 mg/mL. Los glóbulos rojos fueron lisados utilizando *buffer* de lisis amonio-cloruro-potasio (ACK, pH 7) y las células obtenidas fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (Internegocios), β -mercaptoetanol (0,00036%) y antibióticos. Los esplenocitos fueron incubados por triplicado a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos a 37 °C en un ambiente con 5% CO₂ durante 72 h con medio suplementado o 1 µg de ATL.

Análisis de la respuesta inmune celular

Determinación de citoquinas

Los niveles de las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 fueron determinados en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados mediante el ensayo de ELISA sándwich siguiendo las instrucciones de manufactura provistas por el *kit* (mouse ELISA set BD, PharmingenTM). Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM de las concentraciones (pg/mL) calculados mediante la utilización de las curvas estándares provistas por el *kit*.

Análisis de la proliferación celular

La proliferación celular *in vitro* de los esplenocitos estimulados fue medida por el ensayo del bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma, Alemania) como previamente descrito⁽¹⁴¹⁾. Para esto, las células estimuladas por triplicado durante 72 h con ATL (estimuladas) o medio (no estimuladas) fueron incubadas con MTT (0,5 mg/mL) durante 4 h a 37 °C. Luego de descartar el MTT, los cristales de formazán formados en las células fueron solubilizados con 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y la D.O. fue medida a 570 nm. La proliferación celular fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Proliferación celular (razón control no estimulado)} = \frac{D.O. \text{ células estimuladas}}{D.O. \text{ células no estimuladas}}$$

Evaluación de la protección conferida por las formulaciones vacunales

Esquema de inmunización e infección para vacunas de primera generación

Para mejorar la respuesta inmune conferida por las formulaciones vacunales, los animales fueron administrados con 3 dosis de las formulaciones cada 2 semanas utilizando un sistema *prime/boost/boost* homólogos. Las inoculaciones fueron realizadas vía s.c. en la zona interescapular. Dos semanas después de la última dosis, los ratones fueron infectados con 1 x

10^4 promastigotes infectivos (fase estacionaria de crecimiento) de *L. amazonensis* mediante vía intradérmica (i.d.) en la almohadilla plantar del miembro posterior derecho. El desarrollo de la tumefacción fue medido semanalmente hasta el final del protocolo. Finalmente, 11 semanas posteriores a la infección, los animales fueron eutanasiados con el fin de evaluar la protección conferida mediante determinación de la carga parasitaria en la almohadilla plantar derecha y bazo (sólo en protocolo Nro 6) e índice esplénico (figura 14).

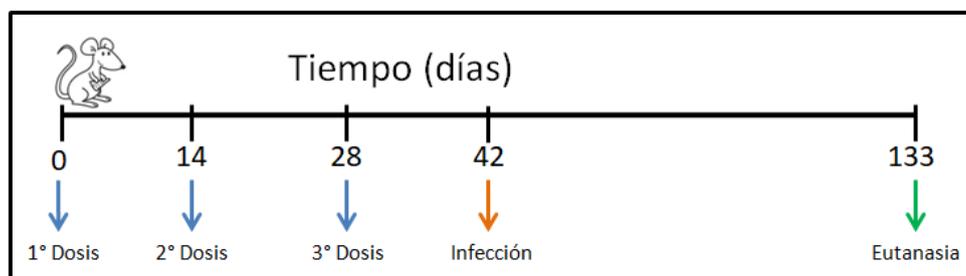


Figura 14. Esquema de inmunización e infección de los protocolos de vacunas de primera generación.

Las formulaciones vacunales fueron preparadas siguiendo las tablas 8 y 9, dependiendo del protocolo

Protocolo Nro 5

Tabla 8. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 5

Grupo	N	ATLs (µg)	Poly (I:C) (µg)	PBS (Hasta completar volumen final: µL/ratón)	Infección (promastigotes/ratón)
Control	6	-	-		
ATLs	6	100	-	100	10000
ATLs + Poly(I:C)	6	100	50		

Protocolo Nro 6

Tabla 9. Formulaciones utilizadas para inmunizar ratones BALB/c correspondiente al protocolo Nro 6

Grupo	N	ATLf (µg)	ATLs (µg)	Poly (I:C) (µg)	Montanide ISA 763 (µL)**	Infección (parásitos/ratón)
Control*	5	-	-	-	-	
ATLf+Poly(I:C)+Montanide	5	100	-	50	140	10000
ATLs+Poly(I:C)+Montanide	5	-	100	50	140	

*Los animales del grupo control fueron inoculados con 200 µL de PBS.

**El volumen de Montanide utilizado se calcula en base a una relación 70:30 con el volumen acuoso, constituido por los ATL, el Poly (I:C) y el vehículo.

En todos los grupos se utilizó PBS como vehículo para completar un volumen final de 200 µL.

Esquema de inmunización e infección para vacunas de tercera generación

Protocolo Nro 7

Las inmunizaciones y grupos de animales fueron las correspondientes al protocolo Nro 4. Veintiún días después de la última dosis, los animales fueron infectados con 1×10^4 promastigotes infectivos (fase estacionaria de crecimiento) de *L. amazonensis* por vía i.d. en la almohadilla plantar del miembro posterior derecho. El desarrollo de la tumefacción fue medido semanalmente hasta la terminación del protocolo. Finalmente, 11 semanas posteriores a la

infección, los animales fueron eutanasiados con el fin de determinar la protección conferida por las formulaciones vacunales mediante la determinación de la carga parasitaria en el sitio primario de infección y el índice esplénico (figura 15).

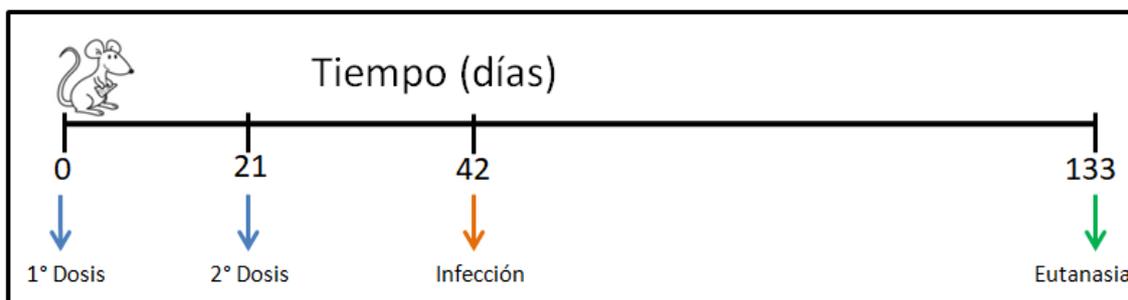


Figura 15. Esquema de inmunización e infección de la vacuna de tercera generación siguiendo el protocolo Nro 7.

Protocolo Nro 8

Las inmunizaciones y grupos de animales fueron las correspondientes al protocolo Nro 4. Veintiún días después de la última dosis, los animales fueron infectados con 1×10^7 promastigotes infectivos (fase estacionaria de crecimiento) de *L. infantum* por vía intraperitoneal (i.p.). Finalmente, los animales fueron eutanasiados 20 días después de la infección y el bazo e hígado fueron removidos con el fin de evaluar la carga parasitaria (figura 16).

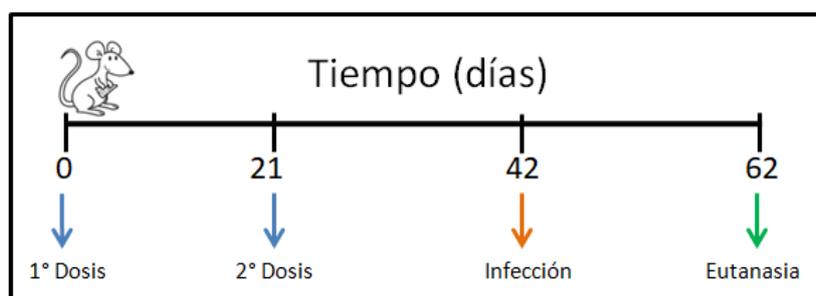


Figura 16. Esquema de inmunización e infección de la vacuna de tercera generación siguiendo el protocolo Nro 8.

Evaluación del seguimiento de la infección por L. amazonensis

Semanalmente, fue medido el espesor de la almohadilla plantar derecha (APD) e izquierda (API) posteriores de los animales infectados. Los valores fueron expresados como la medida de tumefacción (mm), calculada por la sustracción del valor del espesor de la API al de la APD.

Índice esplénico

El índice esplénico fue utilizado como parámetro de visceralización en aquellos protocolos en donde los animales fueron infectados con *L. amazonensis*. Una vez completadas las 11 semanas de infección por *L. amazonensis*, los animales fueron pesados, sacrificados, y sus bazos extraídos y pesados en una balanza analítica. A partir de los valores del peso corporal y del bazo, el índice esplénico fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice esplénico} = \frac{\text{Peso bazo}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Carga parasitaria en animales infectados con L. amazonensis

La determinación de la carga parasitaria en animales infectados con *L. amazonensis* fue realizada en la APD y/o en el bazo, mediante la técnica de dilución límite⁽¹⁴²⁾.

La carga parasitaria en la APD fue determinada en animales de los protocolos Nro 5, 6 y 7, mientras que la determinación de la carga parasitaria en bazo fue efectuada solamente en los animales del protocolo Nro 6.

En el momento del sacrificio, el miembro infectado fue extirpado, la piel fue removida y el miembro fue homogenizado en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos. El homogenato obtenido fue centrifugado a 3000 rpm por 10 min (Beckman Modelo CS-GR) y el pellet resultante fue resuspendido en 500 µL de medio RPMI suplementado con antibióticos y 20% de SFB. Paralelamente, los bazos de los animales fueron extraídos y homogenizados en 500 µL de medio RPMI suplementado con antibióticos y 20% de SFB. Finalmente, 200 µL de los homogenatos de APD o bazo de cada animal fueron colocados en placas de 96 pocillos y 12 diluciones seriadas en base 10 fueron efectuadas con cada muestra. Las placas fueron incubadas a 26 °C por 14 días con el fin de evaluar la presencia de parásitos vivos bajo el microscopio óptico. Los resultados de carga parasitaria fueron expresados –Log del número de parásitos, calculados a partir del último pocillo en el que se observaron promastigotes vivos.

Carga parasitaria en animales infectados con L. infantum

La carga parasitaria en animales infectados por *L. infantum* fue determinada mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real⁽¹⁴³⁾. Para esto, el bazo e hígado de cada animal fueron recolectados individualmente en tubos conteniendo 0,9 mL y 4 mL respectivamente de medio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con SFB 10%, ampicilina 100 UI/mL y kanamicina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich Inc) y luego homogeneizados. Una alícuota de 200 µL de cada homogenato fue utilizado para realizar la extracción de ADN utilizando el kit tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE, Healthcare Lifesciences), de acuerdo a las instrucciones de manufactura. El ADN obtenido fue cuantificado y su pureza analizada mediante espectrofotometría a 260/280 nm, utilizando el espectrofotómetro EPOCH (BioTEK). Adicionalmente, el ADN total fue extraído a partir del hígado y bazo de ratones BALB/c no infectados, los cuales fueron utilizados como controles biológicos negativos para verificar la especificidad de los cebadores.

El ADN total de cada muestra fue ajustado a 10 ng/µL, utilizando 5 µL (50 ng) en cada reacción. La detección del ADN de *L. infantum* fue realizada empleando los cebadores sentido (5'-CCTATTTTACACCAACCCAGT-3 '[JW11]) y antisentido (5'-GGGTAGGGCGTTCTGCGAAA-3' [JW12]), cuyo producto de amplificación es de 120 pares de base (pb), previamente validados⁽¹⁴³⁾.

Cada reacción fue realizada por duplicado, en un volumen final de 20 µL y utilizando 8 µL de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 2 µL de cada cebador (0,2 µM final), 5 µL de muestra (50 ng) o de la curva estándar efectuada a partir de diferentes concentraciones de ADN extraído de *L. infantum* (control positivo) o agua ultra pura (control negativo de la

reacción). La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C, con la construcción de una curva de *melting* utilizando el equipo ABI 7500 (Applied Biosystem). El análisis de los datos fue efectuado mediante el software 7500 System (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, RRID:SCR_018051).

La curva estándar de ADN de *L. infantum* fue construida a partir de diluciones seriadas 1/10 de cantidades de ADN que van desde los 5000 pg a los 0,05 pg obtenido desde el parásito.

La cuantificación de parásitos fue efectuada mediante la correlación de la cantidad de ADN y el número de parásitos, considerando que 1 ADNg = 1 parásito y el ADNg de *L. infantum* tiene alrededor de 0,1 pg. El valor en pg del ADN amplificado en cada muestra en relación a la curva estándar para un valor de umbral de ciclo (Ct) dado fue calculado utilizando el *software* 7500 System program y convertido a número de parásitos⁽¹⁴⁴⁾.

Identificación de antígenos inmunodominantes

La identificación de los antígenos inmunodominantes presentes en las vacunas de primera generación fue efectuada mediante *western blot* en 2D utilizando los sueros de ratones inmunizados con PBS (como control negativo) o con ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763. Los geles fueron realizados por triplicado y los *western blot* por duplicado. Los antígenos seleccionados fueron identificados por espectrometría de masas.

Obtención de proteínas totales de L. amazonensis

Promastigotes de *L. amazonensis* fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado hasta el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Los parásitos muertos fueron eliminados por centrifugación a 50 x g durante 10 min a 4 °C, y 10⁹ promastigotes vivos fueron recolectados y lavados 3 veces con PBS pH 7 (1500 x g, 10 min, 4 °C). El pellet fue resuspendido en 1 mL de *buffer* TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) con inhibidores de proteasa (Sigma P2714). Las muestras fueron sometidas a 5 ciclos de congelamiento (N líquido) descongelamiento (56 °C) y las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) 10%; el pellet obtenido fue lavado con acetona y resuspendido en *buffer* de rehidratación para geles 2D [Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4% (Ludwig Biotec Cat Nro: 7240-90-6)]. Finalmente, las proteínas fueron cuantificadas con el 2D-Quanti kit (GEHealthCare). La integridad de las proteínas obtenidas fue corroborada mediante SDS-PAGE.

Isoelectroenfoque (IEF)

Por cada 250 µg de proteínas fue adicionado *buffer* IPG (*Immobilized pH Gradient*, pH 4-7; 1,5% final), ditioneitol (DTT, 20 mM final) y *buffer* de rehidratación hasta un volumen de 125 µL.

Las tiras de isoelectroenfoque (4 cm, pH 4-7, ReadyStrip IPG Strip, BioRad) fueron rehidratadas en forma pasiva con las muestras durante 24 h a 20 °C. Las mismas fueron sometidas a la focalización isoelectrica en el equipo Ettan Multiphor 3 cubiertas con fluido de cobertura (Plus One Dry Strip Cover Fluid GE HealthCare) bajo las siguientes condiciones: 200 Vh 300 V *step* (STP), 300 Vh 1000 V *gradiente* (GRD), 4800 Vh 5000 V GRD, 3000 Vh 5000 V STP, 18 h 300 V STP, 1 h 5000 V STP.

Electroforesis (Segunda dimensión)

Después del IEF, cada *strip* fue incubado durante 15 min con *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), bromofenol blue 0,002% y DTT 1% (p/v) con el fin de romper los puentes disulfuro. Posteriormente, una segunda incubación fue efectuada durante 15 min con el mismo *buffer*, reemplazando el DTT por iodoacetamida 125 mM, con el fin de acetilar los grupos sulfhídricos.

Luego, los *strips* fueron colocados en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS y sellados con una solución de agarosa, azul de bromofenol y tris-glicina. Un marcador de peso molecular con un rango de 10 a 250 kDa fue utilizado para analizar los tamaños de las proteínas (BioRad Precision Plus Protein Standards Dual Color) y la corrida electroforética fue efectuada a 30 mA/gel hasta que el frente de corrida alcanzó el final empleando un sistema Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad).

Tinción de geles

Los geles utilizados para la tinción con Coomassie Brilliant Blue fueron fijados con una solución de ácido acético al 10% y etanol al 40% durante 2 h. Posteriormente, fueron incubados durante 30 h en agitación con Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal preparado con 20% metanol. Los geles fueron decolorados con metanol 20% durante 1,5 h y guardados a 4 °C sumergidos en una solución de bicarbonato de amonio al 10%. Los mismos fueron digitalizados en el equipo Chemi Doc Imaging System (Bio-Rad).

Western blot

Las proteínas presentes en geles 2D preparados bajo las condiciones descritas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 250 mA constantes durante 2 h utilizando el equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS durante 2 h en agitación. A continuación, fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con un *pool* de sueros (dilución 1/400 en BSA 5% en PBS Tween 20 0,1%) obtenidos de 5 ratones luego de la segunda inmunización con PBS o ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 (Protocolo Nro 3). Inmediatamente, las membranas fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (dilución 1/5000 en BSA 5% en PBS Tween 20 0,1%, Sigma). Finalmente, las membranas fueron reveladas utilizando el reactivo quimioluminiscente Bio Rad Clarity Western ECL y las imágenes fueron adquiridas en el equipo Chemi Doc Imaging System (Bio-Rad).

Digestión proteica

Las imágenes obtenidas a partir de las membranas y los geles fueron superpuestas utilizando el Image Master Platinum (GE HealthCare) y 13 *spots* fueron identificados, extraídos y sometidos a digestión trípica, para ser analizados posteriormente por espectrometría de masa. Adicionalmente, una muestra de una zona del gel sin proteínas y de la proteína correspondiente a los 25 kDa fueron extraídas con el fin de ser utilizadas como control negativo y positivo, respectivamente.

Los *spots* seleccionados fueron extraídos manualmente y desteñidos con una solución de acetonitrilo 50% y bicarbonato de amonio 25 mM pH 8 y deshidratados con acetonilo 50%. El líquido remanente fue eliminado en el equipo Speed Vac (AQ-Vac Eppendorf concentrator plus). Las proteínas fueron digeridas mediante una incubación de 16 h a 37 °C con 10 µL de una

solución de tripsina de páncreas porcino (Sigma) 20 µg/mL (preparada en bicarbonato de amonio y acetonitrilo) y 50 µL de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8. La extracción de péptidos fue realizada 2 veces mediante incubación por 15 min usando 30 µL de una solución de acetonitrilo 50% y ácido fórmico 5%. Finalmente, las muestras fueron concentradas en el SpeedVac hasta los 10 µL. Cada *spot* fue extraído a partir de 3 geles y agrupados para realizar el análisis de identificación proteica.

Análisis por espectrometría de masas

Los péptidos obtenidos fueron sometidos a un análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) en un instrumento de trampa iónica-tiempo de vuelo (IT-TOF). El análisis fue realizado utilizando un espectrómetro de masa electrospray-trampa iónica-tiempo de vuelo (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co) en el servicio de espectrometría de masa de la Universidad de São Paulo según el protocolo ya descrito⁽¹⁴⁵⁾. Brevemente, las alícuotas fueron cargadas usando columnas Discovery C18 (2.2 µm; 100.0 por 3.0 mm) y diluidas en una solución binaria: solvente A agua-ácido fórmico a 999:1 (v/v); solvente B acetonitrilo-agua-ácido fórmico 900:99:1 (v/v/v). Las columnas fueron eluidas a un flujo constante de 0,2 mL/min con un gradiente del 5 al 60% del solvente B por 40 min. Los eluidos fueron monitoreados usando el detector Shimadzu SPD-M20A PDA. Antes de introducirlos al espectrómetro de masa, se mantuvo el voltaje de pulverización a 4,5 kV y el voltaje capilar a 1,76 kV a 200 °C. Los espectros de MS fueron adquiridos bajo modo positivo y recolectados en un rango de masa/carga de 80 a 1850. Los espectros de MS/MS fueron adquiridos de acuerdo a los parámetros de adquisición dependiente de datos (DDA). El control de instrumentos, la adquisición de datos, la generación del formato genérico Mascot (MGF) y el procesamiento de datos fueron realizados utilizando soluciones propias (solución LCMS versión 3.60.361; Shimadzu).

Los resultados de secuencia proteica fueron adquiridos en formato MGF utilizando el software Protein Post Rus Analyses (Shimadzu Co).

Identificación de proteínas

Los archivos MGF generados fueron analizados por Mascot Server versión 2.4 o Peaks Studio versión 7 contra una base de datos personalizada para todas las entradas Uniprot del género *Leishmania* con los siguientes parámetros: 1 clivaje perdido, tolerancia de masa de 0,2 Da, con una modificación fija de carbamido-metil-cisteína y una variable de metionina oxidada.

Los siguientes parámetros fueron tenidos en cuenta para el criterio de selección de las proteínas identificadas: porcentaje de cobertura, *score* total y el E-valor. Además, los péptidos identificados por espectrometría de masa fueron comparados con los teóricos sometidos a la digestión trípica, utilizando la herramienta Peptide Cutter (expasy.org/tools/peptidecutter).

Determinación del peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas identificadas

El punto isoeléctrico y peso molecular experimental fueron calculados utilizando el Programa Image Master Platinum (GE HealthCare). Este análisis fue efectuado en los *spots* analizados por espectrometría de masa. Los datos de punto isoeléctrico y peso molecular teóricos fueron obtenidos mediante la utilización de la herramienta bioinformática Compute pI/Mw (expasy.org/compuete_pi).

Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos entre los grupos de animales, diferentes análisis estadísticos fueron efectuados, dependiendo de cada caso particular: *test* de Student, ANOVA de una o dos vías, y *post-tests* de Dunnet, Tukey o Bonferroni. El programa Graphpad Prism versión 5.0 para Window fue empleado para efectuar los análisis.



RESULTADOS

RESULTADOS

Obtención de promastigotes de *Leishmania in vitro*

Curva de crecimiento de *L. amazonensis*

Los promastigotes de *L. amazonensis* fueron mantenidos en cultivo *in vitro* partiendo de una concentración inicial de 1×10^5 parásitos/mL y diariamente fueron contados con el fin de conocer la curva de crecimiento en las condiciones utilizadas. Al analizar la curva de crecimiento, se observó que la fase de latencia de los mismos duró 48 h, momento en el cual comenzó el crecimiento exponencial hasta las 72 h. En ese momento, el crecimiento disminuyó para entrar en la fase estacionaria, logrando alcanzar una densidad máxima de 4×10^6 parásitos/mL bajo las condiciones en las que fueron cultivados (figura 17).

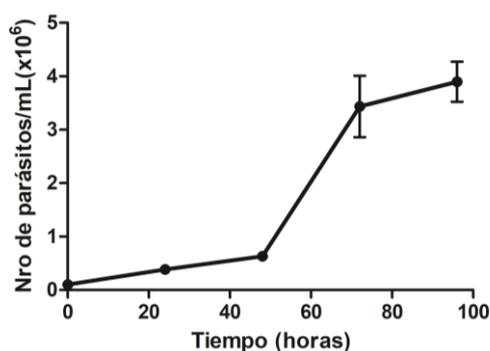


Figura 17. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*. Cada punto representa la concentración de parásitos [Nro parásitos/mL ($\times 10^6$)] determinados cada 24 h.

Curva de crecimiento de *L. infantum*

Los promastigotes de *L. infantum* fueron mantenidos en cultivo *in vitro* partiendo de una concentración inicial de 1×10^5 parásitos/mL. La curva de crecimiento mostró que la fase de latencia de los mismos duró 96 h, momento en el cual comenzó el crecimiento exponencial hasta las 150 h. Luego, la velocidad de crecimiento disminuyó para entrar en la fase estacionaria, logrando una densidad máxima de alrededor de 4×10^7 parásitos/mL bajo las condiciones de cultivo utilizadas (figura 18).

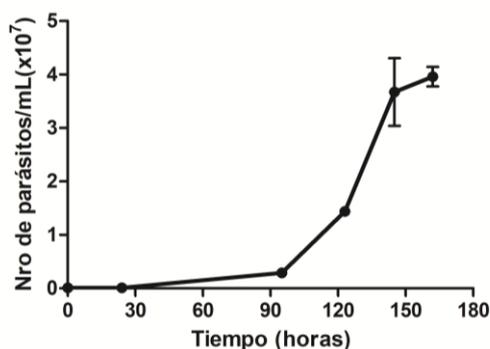
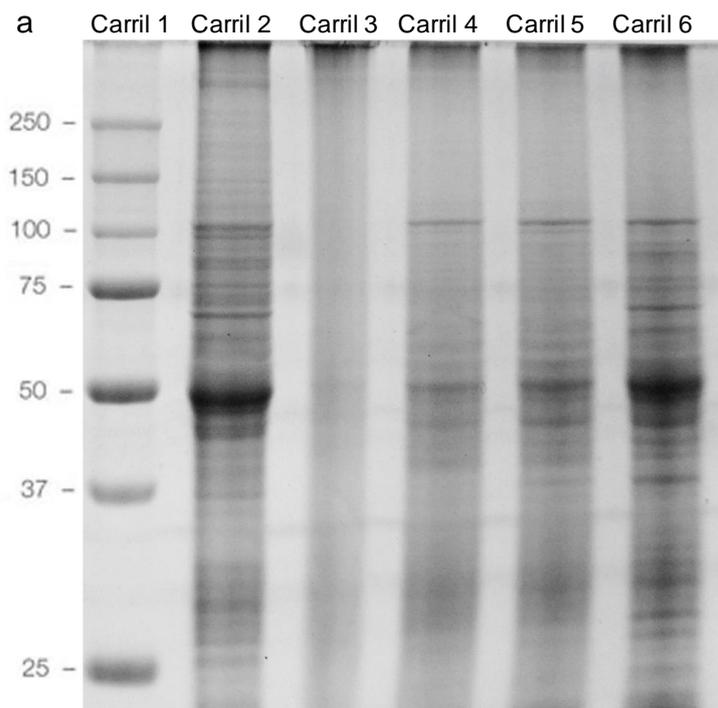


Figura 18. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. Cada punto representa la concentración de parásitos [Nro parásitos/mL ($\times 10^7$)] determinados cada 24 h.

Desarrollo y evaluación de vacunas de primera generación contra la leishmaniosis*Producción y análisis de antígenos de primera generación de L. amazonensis*

Utilizando promastigotes de *L. amazonensis* obtenidos en el inicio de la fase estacionaria, los ATL fueron obtenidos mediante 4 metodologías diferentes (autoclavado, congelamiento/descongelamiento, pasteurizado y sonificado). Los antígenos fueron separados en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) junto con $7,75 \times 10^6$ de promastigotes que no fueron sometidos a ninguna metodología (fresco). En la figura 19a, se puede observar el perfil proteico del cultivo de promastigotes fresco y de los ATLa, ATLf, ATLp y ATLa. Los ATLa y el fresco presentaron un perfil proteico con similar integridad, intensidad y movilidad relativa, abarcando un amplio rango de pesos moleculares que va desde los 25 a los 112 kDa. Por el contrario, los ATLa presentaron una pérdida casi total de la integridad proteica, mientras que los ATLf y ATLp exhibieron una conservación intermedia del perfil proteico. Adicionalmente, fue efectuado un análisis densitométrico y la cuantificación de los pesos moleculares de las bandas proteicas resultantes (figura 19b). Las bandas de 52 y 112 kDa se observaron en todos los carriles (excepto en el correspondiente a los ATLa), aunque la de 52 kDa fue más intensa en el fresco y ATLa.



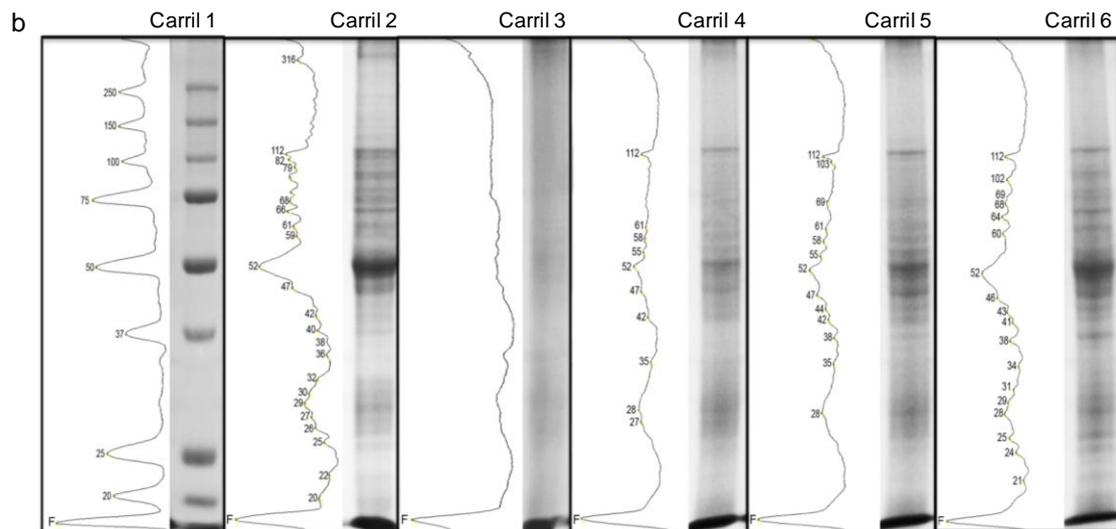


Figura 19. Perfil proteico de los ATL. Se sembraron $7,75 \times 10^6$ del cultivo promastigotes fresco (carril 2), o $60 \mu\text{g}$ de proteínas de ATLa (carril 3), ATLf (carril 4), ATLp (carril 5) y ATLa (carril 6) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En el carril 1 se sembró el marcador de peso molecular y a su lado se muestran los valores correspondientes (kDa) (a). Se realizó el análisis densitométrico y se determinó el peso molecular de las bandas observadas (b).

Evaluación de la respuesta inmune generada por los antígenos de primera generación

Con el fin de evaluar si la metodología de obtención de los ATL influye en la respuesta inmune generada por éstos, ratones BALB/c fueron inmunizados con 2 dosis de los mismos sin el uso de adyuvantes y la respuesta antígeno-específica de anticuerpos y citoquinas fue analizada, tal como se mencionó en materiales y métodos.

Respuesta inmune humoral

La respuesta de anticuerpos mostró que tanto ATLp y como ATLa lograron una seroconversión en ausencia de adyuvantes, reflejado por el incremento estadísticamente significativo respecto al control tanto de IgG como de IgG1. ATLa fue el que generó un mayor aumento de estos anticuerpos, incluso también con una tendencia a mayores niveles de IgG2a (figura 20).

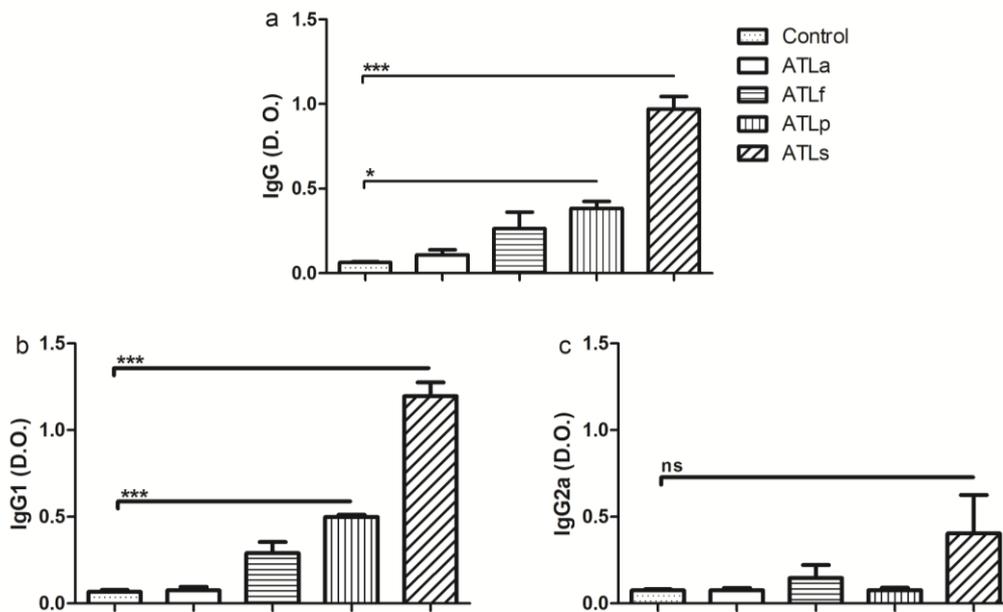


Figura 20. Respuesta inmune humoral en ratones inoculados con los diferentes ATL. Respuesta de anticuerpos IgG anti-ATL usando sueros (dilución 1/500) obtenidos 21 días después de la segunda dosis **(a)**. Anticuerpos IgG1 **(b)** e IgG2a **(c)** anti-ATL usando muestras de suero (dilución 1/1000) obtenidas 21 días después de la segunda dosis. Los datos son representados como la media \pm SEM de los valores de D.O. obtenidos a partir de 4 ratones por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al grupo control: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo, mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y un *post-test* de Dunnet.

Respuesta inmune celular

El desarrollo de una respuesta inmune celular del tipo Th1 es crucial para generar una inmunidad protectora frente a *Leishmania*^(60, 61). Para evaluar el tipo de respuesta Th específica de antígeno, la concentración de citoquinas y la proliferación celular *in vitro* fueron determinadas en los esplenocitos re-estimulados con ATL proveniente de los ratones inmunizados. Como se puede observar en la figura 21, tanto ATLf como ATLS indujeron un incremento significativo en los niveles de IFN- γ respecto al control ($p < 0,05$). Además, tanto ATLf como ATLp provocaron un incremento en los niveles de la citoquina Th2 IL-4 ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente). Por otra parte, sólo ATLf fue capaz de aumentar de manera significativa los niveles de la citoquina reguladora IL-10 ($p < 0,01$). Finalmente, ATLf, ATLp y ATLS indujeron proliferación celular, sin embargo, sólo ATLS logró una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0,05$) (figura 21d).

Estos datos sugieren que ATLf genera un incremento de la respuesta inmune celular de tipo mixto, incluyendo citoquinas del perfil Th1, Th2, y Treg; mientras que ATLS induce una respuesta inmune celular principalmente Th1.

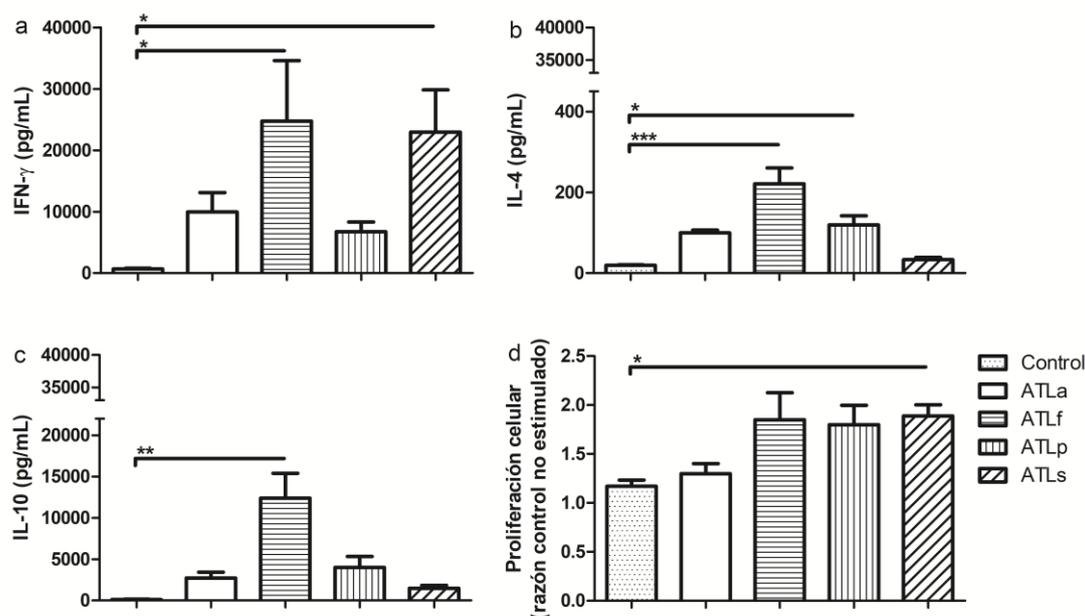


Figura 21. Respuesta inmune celular generada en ratones inoculados con los diferentes ATL. Se determinaron los niveles de citoquinas de IFN- γ (a), IL-4 (b), IL-10 (c) mediante ELISA en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con ATL, obtenidos 21 días después del *boost*; los resultados son representados por la media \pm SEM de la concentración de citoquinas (pg/mL). La proliferación celular fue determinada por MTT en los esplenocitos estimulados (d); los resultados son representados por la media \pm SEM del índice de proliferación (razón control no estimulado). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación al grupo control: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 mediante ANOVA de una vía y un *post-test* de Dunnet.

Evaluación de la respuesta inmune generada por vacunas de primera generación

Los resultados obtenidos han demostrado que los ATLs poseen un perfil proteico conservado y generan una respuesta inmune con bajos niveles de citoquinas anti-inflamatorias y regulatorias acompañado por una elevada producción de IFN- γ y proliferación celular *in vitro* luego de la re-estimulación. Por otra parte, antecedentes previos de nuestro equipo de trabajo demostraron que los ATL obtenidos por congelamiento/descongelamiento formulados con Poly (I:C) o Montanide ISA 763 fueron capaces de proteger contra la infección por *L. amazonensis* mediante la generación una respuesta inmune Th1^(146, 147).

En base a esto, se decidió evaluar la respuesta inmune y protección por parte de los ATLs combinados con Poly (I:C) y de los ATLf o ATLs combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763.

Evaluación de la respuesta inmune generada por la formulación ATLs + Poly (I:C)

Respuesta inmune humoral

Los niveles de IgG fueron evaluados por ELISA 21 días después de cada inmunización, y sus isotipos IgG1 e IgG2a fueron evaluados 21 días después del *boost*.

Las formulaciones de ATLs como ATLs + Poly (I:C) generaron seroconversión luego de la primera dosis (p <0,001) (figura 22a). Al mismo tiempo, los ratones inmunizados con ATLs + Poly (I:C) alcanzaron un incremento estadísticamente significativo de ambos isotipos de IgG comparado con el control, mientras que los ATLs indujeron un incremento de IgG1 pero no de IgG2a. Por otra parte, la formulación de ATLs + Poly (I:C) indujo menores niveles de IgG1 y mayores de

IgG2a que los ATLS sin adyuvante ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente) (figura 22b). Esta respuesta se vio reflejada en el incremento de la razón IgG2a/IgG1 por parte de la formulación vacunal evaluada respecto al grupo ATLS ($p < 0,001$), la cual fue mayor a 1 (figura 22c). Por lo tanto, el adyuvante Poly (I:C) estaría desviando la respuesta inmune humoral de ATLS hacia un perfil Th1.

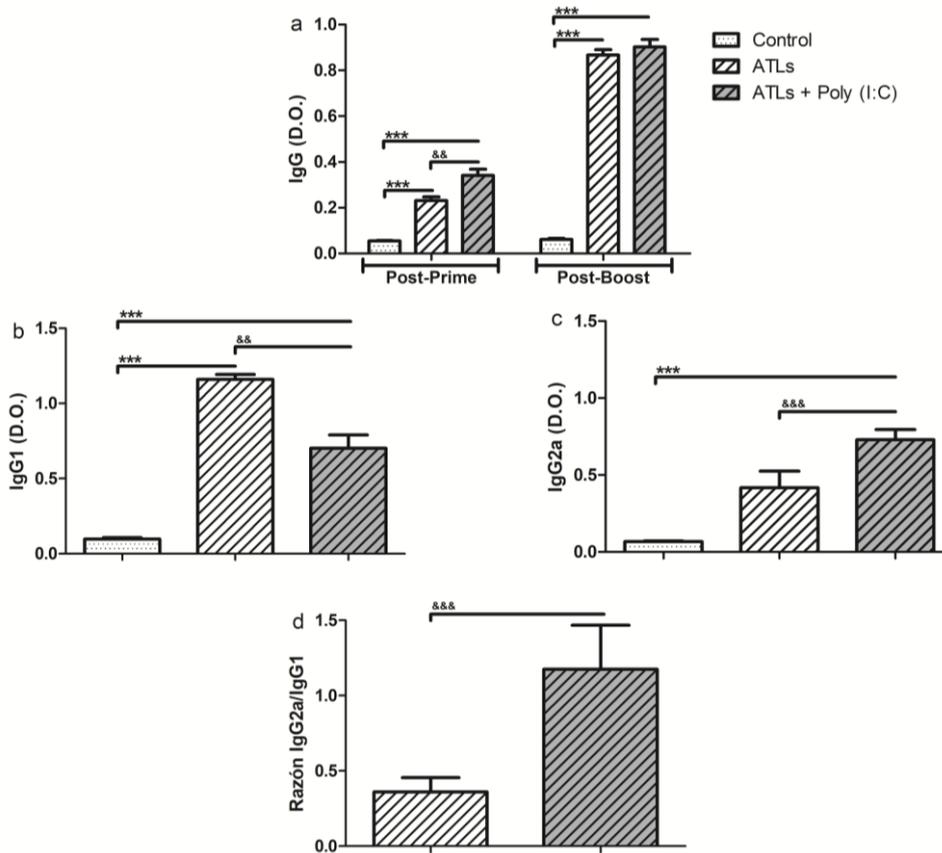


Figura 22. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con ATLS + Poly (I:C). Respuesta de anticuerpos IgG anti-ATL usando sueros (dilución 1/500) obtenidos 21 días después de cada dosis (a). Respuesta de anticuerpos IgG1 (b) e IgG2a (c) anti-ATL usando muestras de suero (dilución 1/500) obtenidas 21 días después de la segunda dosis. Razón IgG2a/IgG1 calculado a partir de los valores obtenidos de los isotipos de IgG evaluados (d). Los datos son representados como la media \pm SEM de los valores de D.O. obtenidos a partir de 5 ratones por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control: *** $p < 0,001$. Los & indican las diferencias significativas respecto al grupo ATLS: && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$ mediante ANOVA de una o dos vías y *post-tests* de Tukey (b y c) o Bonferroni (a) o mediante *t-test* (d).

Respuesta inmune celular

En la figura 23 se puede observar que la formulación ATLS + Poly (I:C) generó mayor producción de IFN- γ que los ATLS respecto al control ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente). Además, el adyuvante Poly (I:C) incrementó la capacidad de los ATLS para producir IL-4 ($p < 0,05$). Por otra parte, este adyuvante fue capaz de reducir la producción de IL-10 por parte de ATLS ($p < 0,001$), llegando incluso hasta niveles basales. Aunque ambos grupos presentaron un incremento significativo de proliferación celular antígeno específica ($p < 0,05$), la formulación ATLS + Poly (I:C) mostró una tendencia a reforzar esta respuesta (figura 23d).

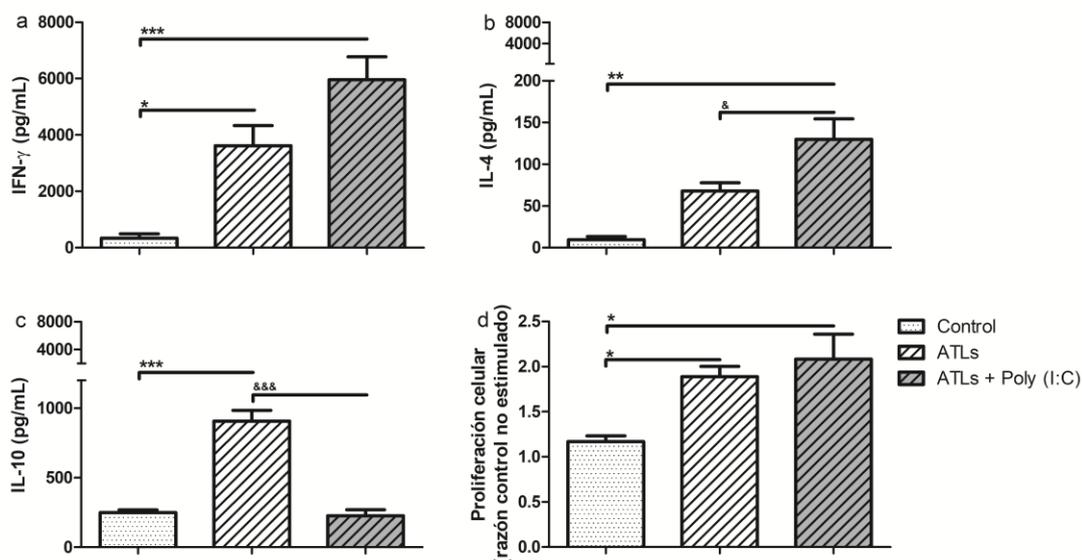


Figura 23. Respuesta inmune celular generada en ratones inmunizados con ATLS + Poly (I:C). Se determinaron los niveles de citocinas de IFN- γ (a), IL-4 (b), IL-10 (c) mediante ELISA en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con ATL, obtenidos 21 días después del *boost*; los resultados son representados por la media \pm SEM de la concentración de citocinas (pg/mL). La proliferación celular fue determinada por MTT en los esplenocitos estimulados; los resultados son representados por la media \pm SEM del índice de proliferación (razón control no estimulado) (d). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y los & indican diferencias significativas respecto al grupo ATLS: & $p < 0,05$; && $p < 0,001$ mediante ANOVA de una vía y un *post-test* de Tukey.

Evaluación de la respuesta inmune generada por las formulaciones ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 y ATLS + Poly (I:C) + Montanide ISA 763

Respuesta inmune humoral

Tanto ATLf como ATLS en combinación con los 2 adyuvante evaluados fueron capaces de generar seroconversión después de la segunda dosis ($p < 0,001$). Sin embargo, la formulación ATLS + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 lo logró incluso antes del *boost* ($p < 0,001$) (figura 24a). Además, ambas formulaciones generaron un incremento en la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a, aunque este último fue significativo sólo en el grupo que recibió la formulación conteniendo ATLS (figura 24c).

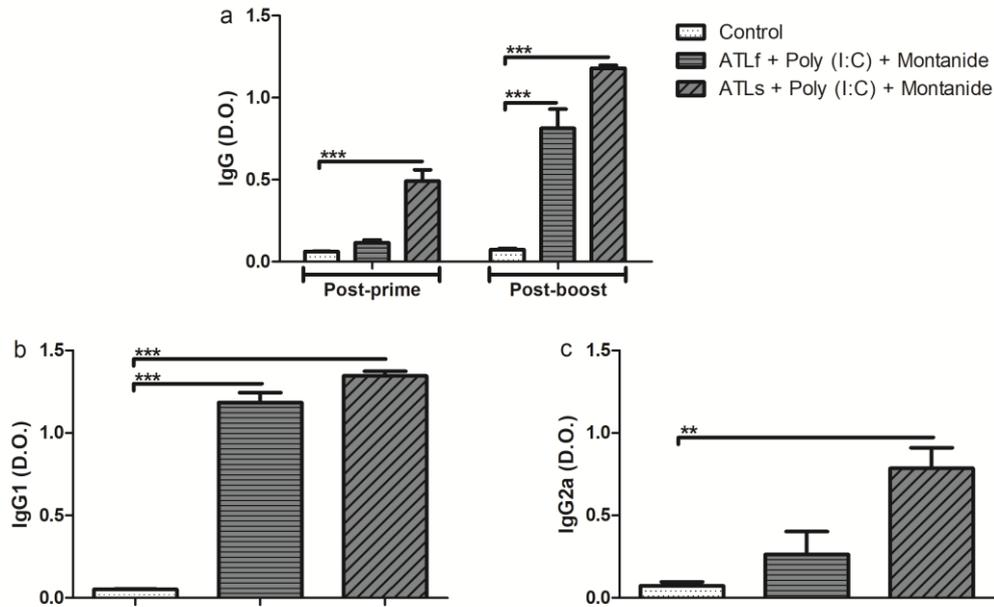


Figura 24. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con ATLf o ATls combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763. Respuesta de anticuerpos IgG anti-ATL usando sueros (dilución 1/400) obtenidos 21 días después de cada dosis (a). Respuesta de anticuerpos IgG1 (b) e IgG2a (c) anti-ATL usando muestras de suero (dilución 1/400) obtenidas 21 días después de la segunda dosis. Los datos son representados como la media \pm SEM de los valores de D.O. obtenidos a partir de 5 ratones por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ mediante ANOVA de una o dos vías y *post-tests* de Dunnet o Bonferroni.

Respuesta inmune celular

Como se puede observar en la figura 25, la formulación ATls + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 generó un incremento significativo de los niveles de IFN- γ ($p < 0,001$), IL-4 ($p < 0,01$) e IL-10 ($p < 0,001$) y de proliferación celular ($p < 0,001$) respecto al control no inmunizado. Por su parte, la vacuna que contenía ATLf en su formulación logró un aumento de IFN- γ ($p < 0,05$), IL-4 ($p < 0,05$) y de proliferación celular ($p < 0,01$) respecto al control, aunque con menores valores que la formulación ATls + Poly (I:C) + Montanide ISA 763.

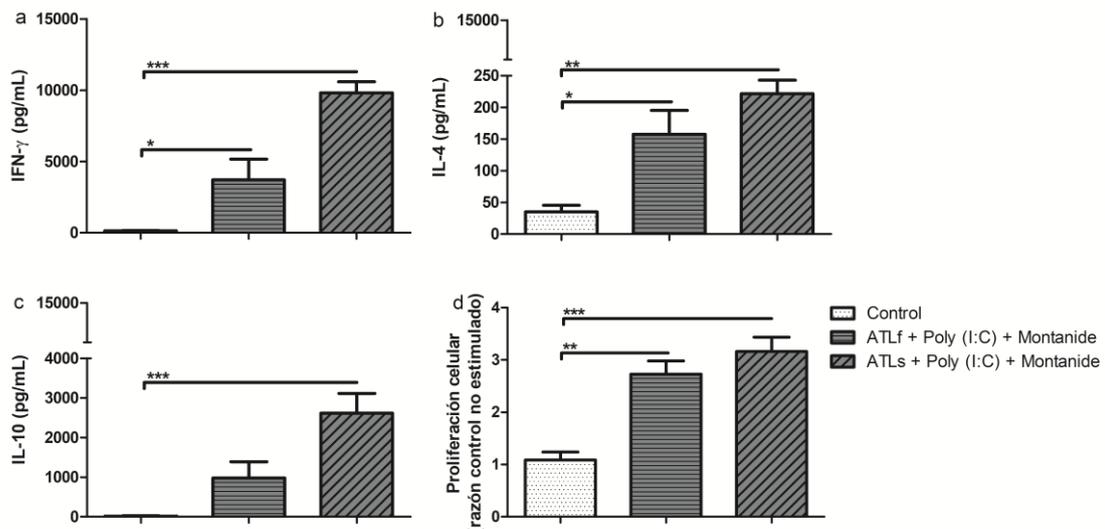


Figura 25. Respuesta inmune celular generada en ratones inmunizados con ATLf o ATls combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763. Se determinaron los niveles de citoquinas de IFN- γ (a), IL-4 (b), IL-10 (c) mediante ELISA en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con ATL, obtenidos 21 días después del

boost; los resultados son representados por la media \pm SEM de la concentración de citoquinas (pg/mL). La proliferación celular fue determinada por MTT en los esplenocitos estimulados; los resultados son representados por la media \pm SEM del índice de proliferación (razón control no estimulado) (**d**). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con grupo control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ mediante ANOVA de una vía y un *post-test* de Dunnet.

Evaluación de la protección conferida por vacunas de primera generación contra la infección por *L. amazonensis*

Con el fin de evaluar la efectividad de la respuesta inmune generada por las vacunas de primera generación, los ratones inmunizados fueron infectados con 10^4 promastigotes de *L. amazonensis* en la APD y se analizaron diferentes parámetros: tumefacción de la almohadilla plantar, índice esplénico y carga parasitaria por dilución límite en la APD y/o en el bazo.

Evaluación de la protección conferida por la formulación ATls + Poly (I:C)

Los ratones inmunizados con ATls + Poly (I:C) mostraron un menor desarrollo de la lesión en la APD respecto al grupo control y al que recibió ATls. La formulación que contenía Poly (I:C) logró alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) a partir de la semana 8 post-infección (figura 26a); esta diferencia se fue acentuando luego de la semana 9 ($p < 0,001$).

La carga parasitaria en el sitio primario de infección y el índice esplénico fueron determinados 11 semanas después de la infección. Como se puede observar en la figura 26b, la carga parasitaria fue significativamente menor en el grupo inmunizado con ATls + Poly (I:C), que en el que recibió ATls ($p < 0,05$), pero esta diferencia no fue significativa cuando se comparó con el grupo control. El índice esplénico fue utilizado como parámetro de visceralización de los parásitos hacia este órgano blanco, debido a que la presencia de los mismos en el bazo es causante de un infiltrado leucocitario inflamatorio y expansión linfocitaria que generan esplenomegalia^(148, 149). Los datos mostraron una reducción significativa del índice esplénico por parte del grupo inmunizado con la formulación vacunal que contiene el adyuvante, respecto al grupo control ($p < 0,05$), con valores similares a lo observado en ratones control no infectados (figura 26c).

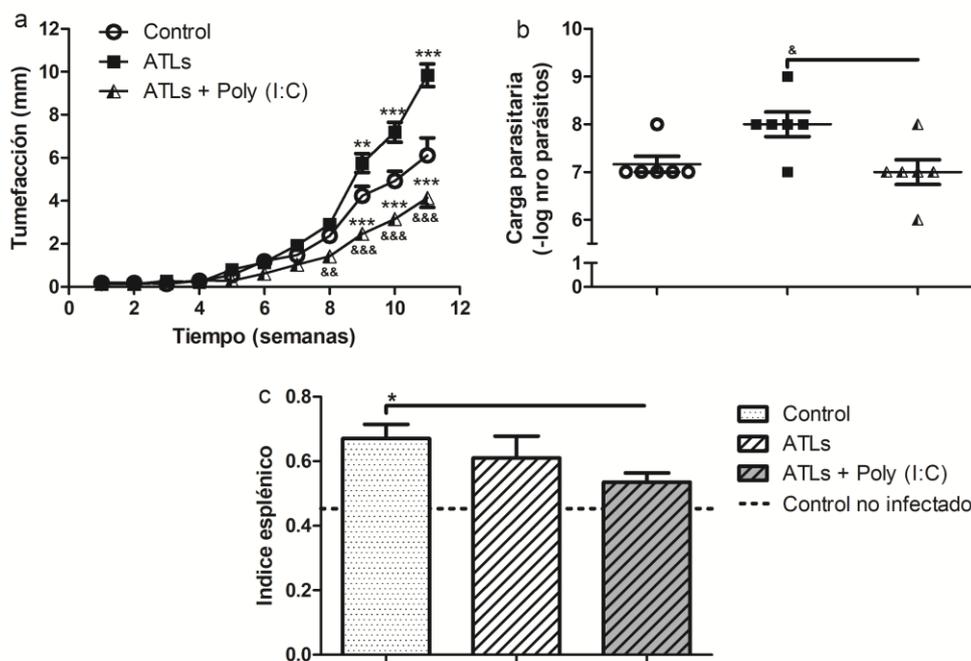


Figura 26. Ensayo de protección en animales inmunizados con ATLs + Poly (I:C) frente a la infección por *L. amazonensis*. Tumefacción generada por la infección con *L. amazonensis*; los valores son expresados como media \pm SEM de la tumefacción (mm) medida semanalmente (a). Carga parasitaria en la almohadilla plantar infectada, el número de parásitos viables fue determinada por dilución límite 11 semanas después de la infección; los valores son expresados como media \pm SEM de la carga parasitaria (-log nro de parásitos) obtenida (b). El índice esplénico fue calculado en los animales 11 semanas después de la infección y en un grupo de animales no infectados de la misma edad (control no infectado); los valores son expresados como media \pm SEM del índice esplénico (c). Todas las determinaciones fueron realizadas utilizando 6 animales por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los & indican diferencias significativas respecto al grupo ATLs: & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$ por ANOVA de una o dos vías, *post-tests* de Tukey o Bonferroni.

Evaluación de la protección conferida por las formulaciones ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 y ATLs + Poly (I:C) + Montanide ISA 763

Los resultados de la figura 27 demuestran que ambas formulaciones evaluadas lograron reducir significativamente el tamaño de la lesión en la APD respecto al grupo control ($p < 0,05$) a partir de la semana 7 *post*-infección, acentuándose aún más a partir de la semana 8 ($p < 0,001$) (figura 27a).

La carga parasitaria en el sitio primario de infección y bazo, así como el índice esplénico fueron determinados 11 semanas después de la infección. Como se puede observar en la figura 27b, ambas formulaciones lograron reducir significativamente la carga parasitaria en el sitio primario de infección respecto al control ($p < 0,05$), además se observó una tendencia a menores valores por parte del grupo que recibió la formulación conteniendo ATLf. La formulación ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 mostró una mayor tendencia a generar protección de la infección en el bazo que la formulación que contenía ATLs en su composición (figura 27c). Finalmente, los ratones inmunizados con las formulaciones evaluadas presentaron valores significativamente menores de índice esplénico respecto al grupo control infectado ($p < 0,01$) manteniendo los niveles normales de este parámetro (figura 27d).

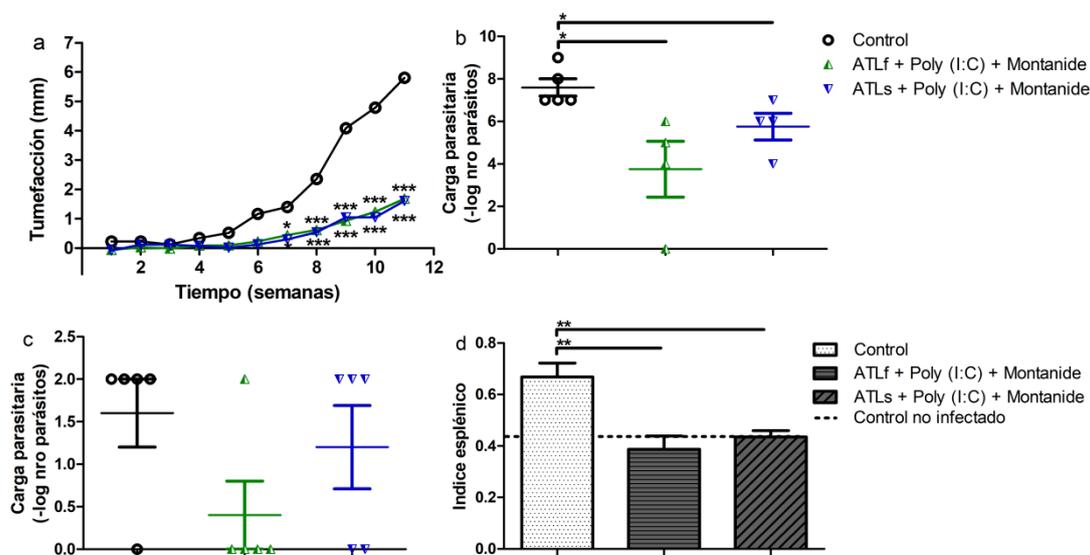


Figura 27. Ensayo de protección en animales inmunizados con ATLf o ATLS + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 frente a la infección por *L. amazonensis*. Tumefacción semanal generada por la infección con *L. amazonensis* (a); los valores son expresados como media \pm SEM de la tumefacción (mm). Carga parasitaria en la almohadilla plantar infectada (b) y en bazo (c), el número de parásitos viables fue determinado 11 semanas después de la infección por dilución límite; los valores son expresados como media \pm SEM de la carga parasitaria (-log número de parásitos). El índice esplénico fue calculado en los grupos de animales 11 semanas después de la infección y en un grupo de animales no infectados de la misma edad (control no infectado) (d); los valores son expresados como media \pm SEM del índice esplénico. Todas las determinaciones fueron realizadas utilizando 5 animales por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ por ANOVA de una o dos vías y *post-tests* de Dunnet o Bonferroni.

Identificación de antígenos inmunodominantes en vacunas de primera generación

Si bien las vacunas de primera generación son una opción económica y relativamente sencilla de obtener vacunas, las mismas no son altamente reproducibles, es por esto que es indispensable continuar indagando en la obtención de proteínas recombinantes para el desarrollo de formulaciones de nueva generación. Para lograrlo, uno de los elementos más trascendental es la selección de la proteína a utilizar, y una buena estrategia para conseguirlo es identificar a los antígenos más inmunodominantes, es decir aquellos que son reconocidos por sueros de pacientes (o animales de experimentación) inmunizados con vacunas de primera generación que hayan presentado protección contra la infección.

Para identificar los antígenos más inmunodominantes de nuestras formulaciones vacunales, las proteínas totales de *L. amazonensis* fueron separadas en geles de 2 dimensiones (figura 28a). Luego, para evaluar la antigenicidad (propiedad de ser blanco de una respuesta inmune) de los *spots* obtenidos, se efectuaron *immunoblots* en 2D. Para esto, se incubaron las membranas con un *pool* de sueros de ratones inmunizados con PBS (control) o ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763, debido a que ésta protegió considerablemente a los ratones inmunizados frente a la infección por *L. amazonensis*.

Los resultados del análisis por *western blot* mostraron que los sueros obtenidos de ratones inoculados con PBS reconocieron 4 proteínas, por lo que éstas no fueron consideradas en el

análisis (marcadas en azul en la figura 28b), debido a que son consideradas reacciones inespecíficas.

Por otra parte, una gran cantidad de proteínas fueron reconocidas por los sueros de los ratones inmunizados. Las mismas estuvieron distribuidas principalmente entre los 35 y 250 kDa y un pl entre 4 y 5 (figura 28c). Finalmente, 2 *spots* fueron reconocidos tanto por los sueros de los animales que recibieron PBS, como por los inmunizados con la vacuna evaluada, correspondiendo a una reactividad cruzada (círculos azules figura 28c), por lo que fueron excluidas del análisis de identificación por espectrometría de masas.

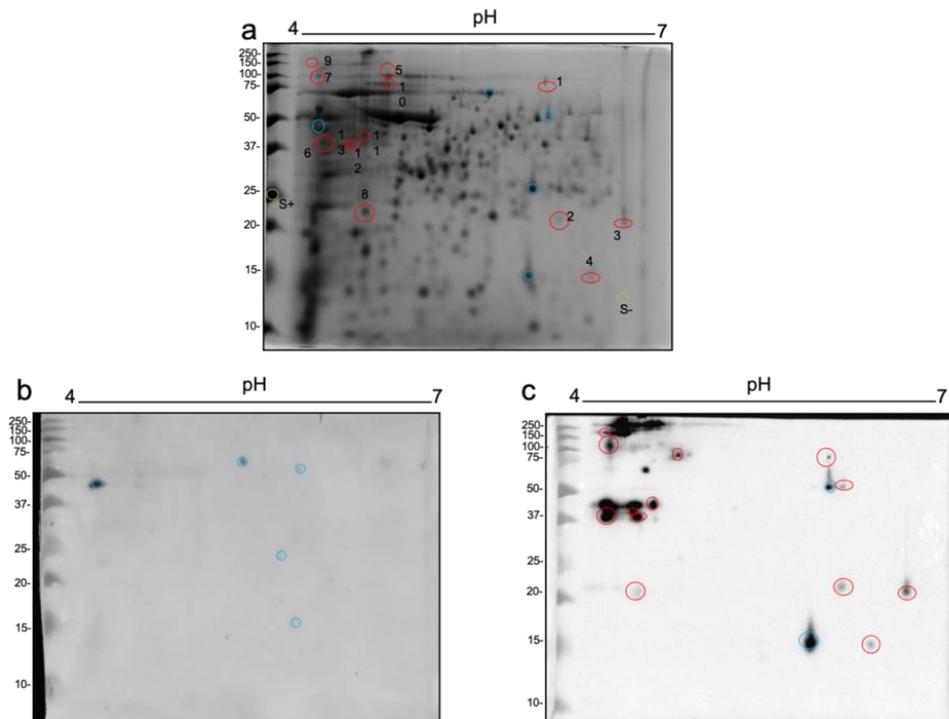


Figura 28. Análisis de *western blot* y perfil proteico de antígenos totales de promastigotes de *L. amazonensis* en geles bidimensionales. Proteínas totales de promastigotes de *L. amazonensis* (250 μ g) separadas en gel de 2D teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250 (a). *Western blot* incubados con *pool* de sueros obtenidos de ratones control (b) y de ratones inmunizados con ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 (c) (dilución 1:400). Los anticuerpos unidos presentes en el suero fueron detectados con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón (dilución 1:5000). El eje x representa el pH (4-7) que permite separar las proteínas por su punto isoeléctrico (pI), mientras que el eje y representa el peso molecular (kDa). Los círculos rojos representan los *spots* analizados por espectrometría de masa, los azules las proteínas inespecíficas y los círculos verdes los controles positivo y negativo utilizados en el análisis por espectrometría de masas.

Los perfiles de los *spots* tanto de los geles 2D como del *western blot* fueron reproducibles en término del número total de proteínas y su posición e intensidad relativa. Esto se debe a que a pesar de que este ensayo fue realizado por triplicado (geles) y duplicado (*western blot*), se observaron resultados similares entre ellos, siendo la figura 28 una imagen representativa de los mismos.

De las proteínas observadas, se aislaron 13 *spots* (marcados en rojo en figura 28a y 28c) y los controles positivo (proteína conocida del marcador de peso molecular) y negativo (gel sin proteína visible) (marcados en verde en figura 28a) y se analizaron por espectrometría de masa siguiendo la metodología detallada en materiales y métodos.

Luego del análisis por espectrometría de masa, 4 *spots* fueron identificados y considerados positivos de acuerdo al criterio de inclusión detallado en materiales y métodos. Los *spots* identificados fueron: 3, 6, 7 y 11.

En la tabla 10, se detallan los valores de peso molecular (PM, en kDa) y punto isoeléctrico (pI), tanto teóricos y experimentales (exp) de cada *spot* identificado y considerado positivo.

Tabla 10. Resultado del análisis por alineamiento de los fragmentos obtenidos en la espectrometría de masa.

<i>Spot</i>	pI exp	pI teórico	PM exp	PM teórico
3	7,002	6,89	21	21
6	4,25	5,28	39	38
7	4,199	4,22	105	72
11	4,627	6,51	44	43,6

Análisis de la conservación filogenética de las proteínas identificadas

Mediante la utilización de la herramienta bioinformática *on line* BLASTp, las secuencias proteicas obtenidas fueron comparadas con aquellas presentes en la base de datos del género *Leishmania* (taxid: 5658) y de la familia Trypanosomatidae (Taxid: 5654), del ser humano (*Homo sapiens* Taxid: 9606) y los caninos (*Canis lupus familiaris* Taxid: 9615). Los datos obtenidos no son mostrados debido a la protección de datos intelectuales.

La proteína identificada en el *spot* número 3 mostró estar altamente conservada entre las diferentes especies de *Leishmania*, alcanzando una identidad de secuencia que va desde el 80,40 al 96,98% con la misma proteína perteneciente a otras especies del género *Leishmania* que causan diferentes manifestaciones clínicas. Además, esta misma proteína se encuentra conservada con algunas presentes en especies de la familia Trypanosomatidae que generan enfermedades en el ser humano como Chagas (*T. cruzi*), tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño (*T. brucei*), con una identidad de secuencia proteica de hasta el 71,57%. Por último, esta proteína presenta un escaso grado de conservación al ser comparada con la base de datos del ser humano y el perro, alcanzando un porcentaje de identidad no mayor del 60%.

Por su parte, la proteína identificada en el *spot* 6, es una proteína no caracterizada que presenta un elevado grado de conservación entre las diferentes especies del género *Leishmania* incluso con especies que generan manifestaciones clínicas tan diferentes como es *L. infantum* responsable de la leishmaniosis visceral, logrando en este caso un porcentaje de identidad del 98,81%, 100% de cobertura y un valor E de 0. Contrariamente, esta misma proteína no está muy conservada respecto a organismos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae que generan enfermedades en humanos, excluyendo el género *Leishmania*, dando en valores identidad máximos alrededor del 40%. Sin embargo, esta misma proteína no presenta ningún tipo de identidad de secuencia con las proteínas presentes en la base de datos de las especies *H. sapiens* y *C. lupus familiaris*.

La proteína identificada en el *spot 7* es una proteína repetitiva que presenta una elevada conservación con un porcentaje de identidad de hasta más del 99% entre las diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo aquellas que generan manifestaciones clínicas diferentes. La misma presenta un grado de conservación moderado cuando es comparada con otras especies de la familia Trypanosomatidae que generan enfermedades en el ser humano y canes como es *T. cruzi*, manteniendo una identidad mayor al 60%. Al mismo tiempo, esta proteína presenta un bajo grado de conservación respecto a las proteínas del ser humano y el perro presentes en la base de datos utilizada, alcanzando apenas un 40,23% de identidad máximo con un porcentaje de cobertura que no llega al 60%.

Finalmente, la proteína identificada en el *spot 11* también está muy conservada dentro del género *Leishmania*, alcanzando un porcentaje de identidad de hasta el 98,74% y una cobertura total con especies diferentes de *Leishmania* que causan otras manifestaciones clínicas de esta enfermedad como *L. infantum* (98,74% de identidad, valor E de 0), *L. mexicana* (97,73% de identidad, valor E de 0), *L. braziliensis* y *L. panamensis* (ambas con una identidad del 91,41% y valor E de 0). La misma presenta un grado de conservación moderado cuando es comparada con parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y que producen otras enfermedades en el ser humano, alcanzando en este caso valores cercanos al 70% de identidad de secuencia proteica. Por último, esta proteína no presenta elevados valores de conservación filogenética al ser comparada con la base de datos del ser humano y los canes, ya que presenta una identidad máxima del 45,6% con algunas proteínas.

Desarrollo y evaluación de vacunas de tercera generación contra la leishmaniosis

Análisis de la conservación filogenética de LOxy

Al analizar el alineamiento de proteínas mediante BLASTp utilizando la base de datos de NCBI, se observó que la proteína rLOxy posee una elevada conservación, alcanzando una identificación que va desde 93,71% con *L. guyanensis* hasta un 98,43% con *L. major* (figura 29).

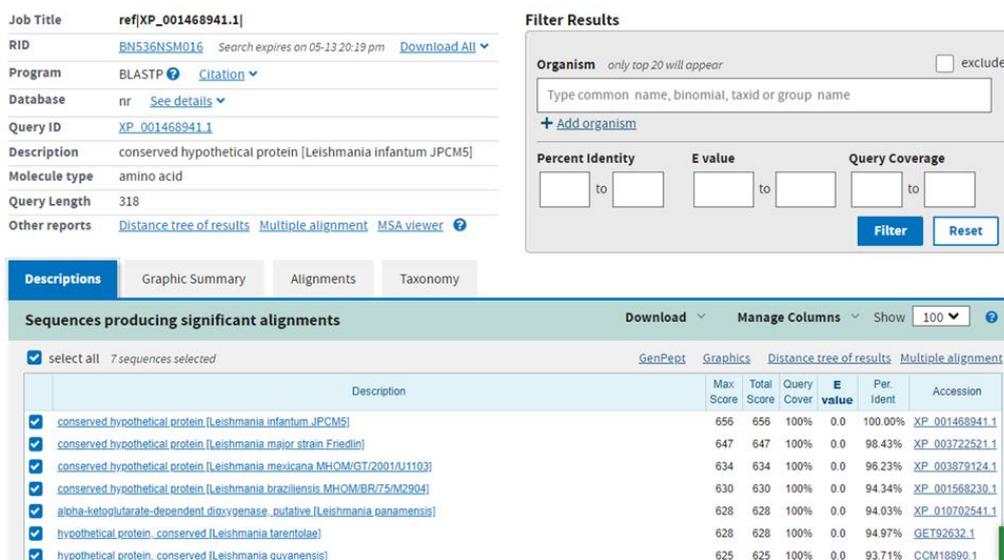


Figura 29. Resultados del análisis filogenético de la proteína LiHyp1 en BLASTp utilizando la base de datos del género *Leishmania*.

Producción y análisis de la proteína recombinante rLOxy de L. infantum

La proteína recombinante rLOxy de *L. infantum* fue obtenida en un sistema de expresión bacteriano utilizando el plásmido de expresión pET21a-GEN. La expresión de la proteína fue inducida utilizando el reactivo IPTG y luego purificada mediante la utilización de columnas de afinidad ligadas a Ni. Las bacterias cultivadas sin la incubación con IPTG, así como las inducidas con este reactivo y la proteína purificada fueron sembradas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En la figura 30 puede observarse el patrón proteico obtenido para cada caso. Es importante recalcar el alto grado de pureza de la proteína rLOxy observado luego de someter la muestra de bacterias inducidas a la columna de Ni. Además, se distinguieron 2 bandas cercanas al peso molecular de la proteína rLOxy (36,5 kDa) y el doble de su tamaño (73 kDa), que podría deberse al agregado de la misma. Esto fue confirmado mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo anti-His (figura 30b).

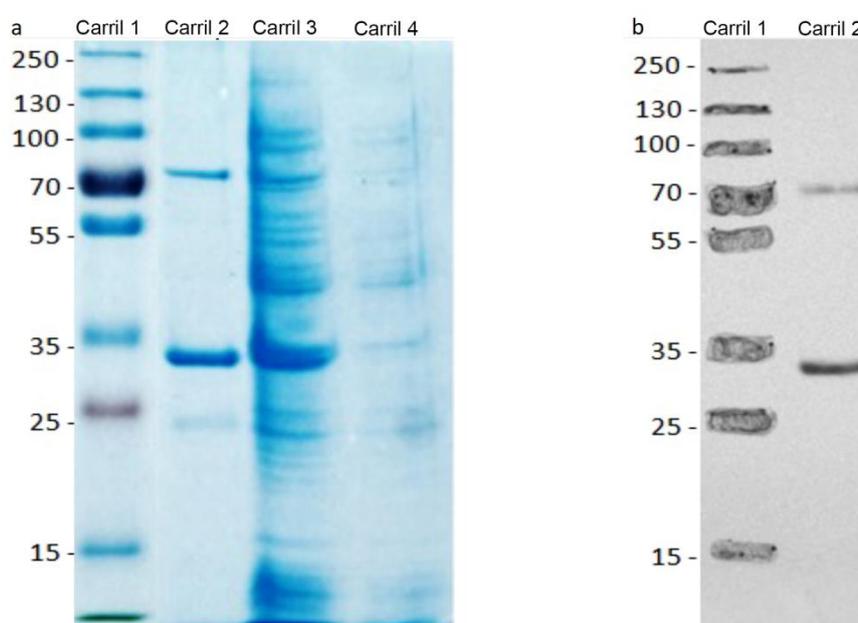


Figura 30. Obtención de la proteína rLOxy. Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), donde se sembró: el marcador de peso molecular (carril 1); la proteína rLOxy purificada (carril 2); las proteínas procedentes de la bacteria C41 inducida con IPTG (carril 3); y las proteínas correspondientes a las bacterias no inducidas con IPTG (carril 4) **(a)**. *Western blot* confirmatorio de la obtención de la proteína recombinante obtenida, utilizando un anticuerpo anti-His (carril 2) **(b)**.

Caracterización física de las formulaciones vacunales de tercera generación

La tabla 11 muestra las características físicas observadas en las formulaciones vacunales de tercera generación, como: diámetro, índice de polidispersión (IP, mm), potencial Z (PZ, mV) y tasa de encapsulación (ER, %). El diámetro de las partículas fue determinado mediante NTA, el IP y el PZ mediante DLS, finalmente la tasa de encapsulación fue calculada tal como se detalló en la sección de materiales y métodos. Se pudo observar que la adición de la proteína recombinante y/o el adyuvante Poly (I:C) a los LC generó un incremento del diámetro e IP, debido a un agregado de las partículas. Por otra parte, de acuerdo al valor de IP, los LC pueden considerarse partículas con baja polidispersión y la adición de la proteína y el adyuvante a los LC indujo la formación de partículas polidispersas. Esos cambios estuvieron acompañados por una disminución del potencial Z esperable debido a la carga negativa de la proteína y el adyuvante, aunque el PZ permaneció positivo. Finalmente, la tasa de encapsulación de la proteína sin

adyuvante fue de alrededor de 60%, mientras que la adición del adyuvante Poly (I:C) disminuyó la misma, atribuible a una competición entre la rLOxy y el adyuvante a interactuar con los LC.

Tabla 11. Caracterización física de las formulaciones vacunales contenidas en vesículas

Formulación	Diámetro ± SD (nm)	IP ± SD (mm)	PZ ± SD (mV)	ER ± SD (%)
rLOxy	158,4 ± 5,7	0,17 ± 0,01	-	-
rLOxy + Poly (I:C)	175,4 ± 7,5	0,36 ± 0,16	-	-
LC	127,6 ± 0,577	0,14 ± 0,01	+97,0 ± 26,7	-
rLOxy + LC	207,8 ± 21,6	0,50 ± 0,15	+70,3 ± 25,8	57,8 ± 7,6
rLOxy + LC + Poly (I:C)	158,7 ± 47,5	1,0	+55,0 ± 5,6	45,5 ± 6,3

Los datos son expresados como la media ± desviación estándar (SD) de cada parámetro analizado. El análisis fue efectuado utilizando un n de 3. Las mediciones fueron realizadas en solución 0,15 M de NaCl; nm: nanómetros; IP: índice de polidispersión (mm); PZ: potencial Zeta en milivoltios (mV); ER: Tasa de encapsulación porcentual.

Evaluación de la respuesta inmune generada por vacunas de tercera generación

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de las formulaciones vacunales de tercera generación, ratones BALB/c fueron inmunizados con 2 dosis cada 21 días, utilizando: rLOxy, rLOxy + LC, o rLOxy + LC + Poly (I:C). Veintiún días después de cada dosis, fue determinada la respuesta de anticuerpos IgG y 21 días después del *boost* fueron medidos los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2a.

Como puede observarse en la figura 31a, los grupos inmunizados con formulaciones que contienen LC lograron la seroconversión luego de haber recibido la segunda dosis. Al mismo tiempo, estos grupos generaron un incremento significativo de los niveles de IgG1 (figura 31b), mientras que sólo los ratones del grupo rLOxy + LC lograron aumentar significativamente los niveles de IgG2a (figura 31c).

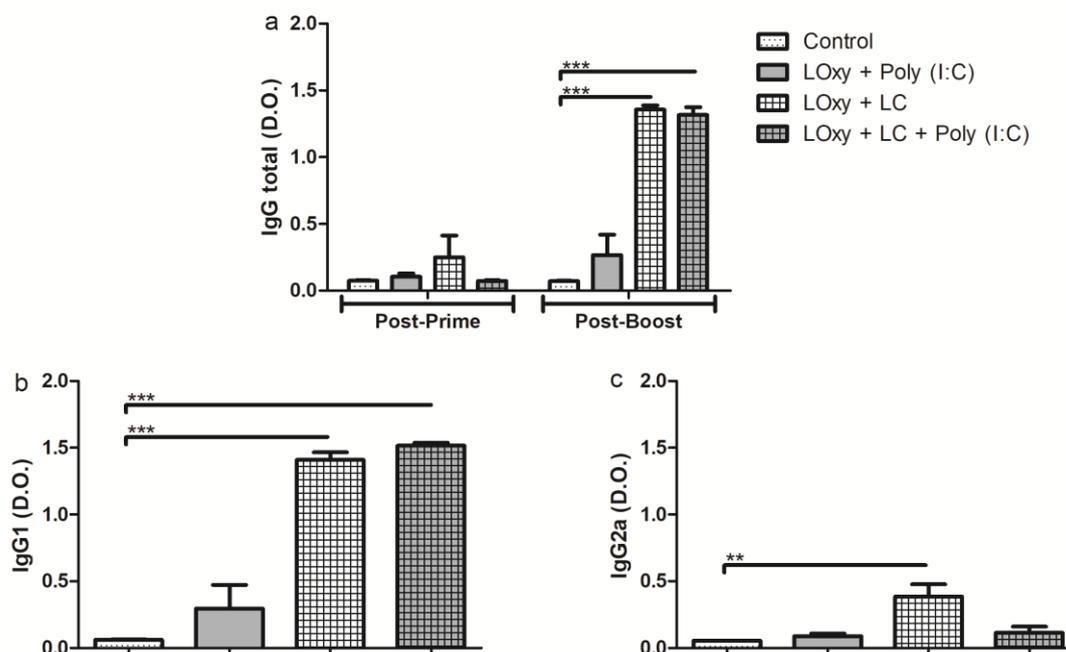


Figura 31. Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con vacunas de tercera generación. Respuesta de anticuerpos IgG anti-rLOxy usando sueros (dilución 1/100) obtenidos 21 días después de cada dosis (a). Respuesta de anticuerpos IgG1 (b) e IgG2a (c) anti-rLOxy usando muestras de suero (dilución 1/100) obtenidas 21 días después de la segunda dosis. Los datos son representados como la media ± SEM de los valores de D.O. obtenidos a partir de 5 ratones por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control: **p<0,01; ***p<0,001 mediante ANOVA de una o dos vías y *post-tests* de Dunnet (b y c) o Bonferroni (a).

Evaluación de la protección conferida por vacunas de tercera generación contra la infección por L. amazonensis

Con el fin de evaluar si respuesta inmune generada por las vacunas de primera generación logró proteger a los animales de experimentación frente a una infección heteróloga, los ratones inmunizados fueron infectados con 10^4 promastigotes de *L. amazonensis* en la APD 21 días después del *boost* y diferentes parámetros fueron analizados: tumefacción de la almohadilla plantar semanalmente, índice esplénico y carga parasitaria por dilución límite en el sitio primario de infección 11 semanas después de la infección.

Como puede observarse en la figura 32a, los ratones inmunizados con la formulación rLOxy + LC + Poly (I:C) presentaron una menor tumefacción que el grupo control, manifestando una diferencia significativa a partir de la semana 8 (p<0,01), viéndose incrementada luego de la semana 9 (p<0,001).

Por otra parte, la formulación que contiene la proteína recombinante y el adyuvante Poly (I:C) combinados con los LC generó una tendencia a menores valores de carga parasitaria en la ADP y de índice esplénico (figura 32b y 32c).

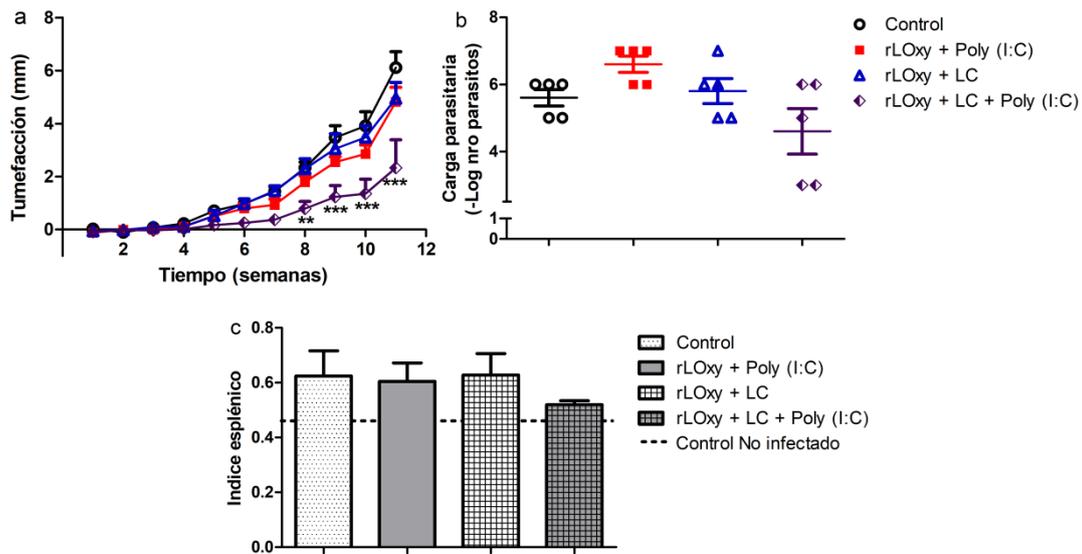


Figura 32. Ensayo de protección en animales inmunizados con vacunas de tercera generación frente a la infección por *L. amazonensis*. Tumefacción semanal generada por la infección con *L. amazonensis*; los valores son expresados como media \pm SEM de la tumefacción (mm) (**a**). Carga parasitaria en la almohadilla plantar infectada, el número de parásitos viables fue determinado 11 semanas después de la infección por dilución límite; los valores son expresados como media \pm SEM de la carga parasitaria (-log número de parásitos) obtenida (**b**). El índice esplénico fue calculado 11 semanas después de la infección y en un grupo de animales no infectados de la misma edad (control no infectado); los valores son expresados como media \pm SEM del índice esplénico (**c**). Todas las determinaciones fueron realizadas utilizando 5 animales por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ por ANOVA de 1 o 2 vías y *post-tests* de Dunnet (b y c) o Bonferroni (a).

*Evaluación de la protección conferida por vacunas de tercera generación contra la infección por *L. infantum**

Con el fin de evaluar la efectividad de la respuesta inmune generada por las vacunas de tercera generación frente a una infección homóloga, los ratones inmunizados fueron infectados con 10^7 promastigotes de *L. infantum* vía i.p. 21 días después de la segunda dosis. La carga parasitaria fue determinada 20 días después de la infección, mediante qPCR en tiempo real en bazo e hígado.

Las 3 formulaciones evaluadas lograron proteger frente a la infección por *L. infantum* en bazo ($p < 0,001$), el principal sitio de infección de las especies que generan leishmaniosis visceral (figura 33a). Por otra parte, tanto la formulación rLOxy + Poly (1:1), como la formulación rLOxy + LC + Poly (1:1), lograron una disminución significativa de la carga parasitaria en el hígado respecto al control (figura 33b), siendo más acentuada cuando los ratones fueron inmunizados con formulación rLOxy + LC + Poly (1:1) ($p < 0,01$).

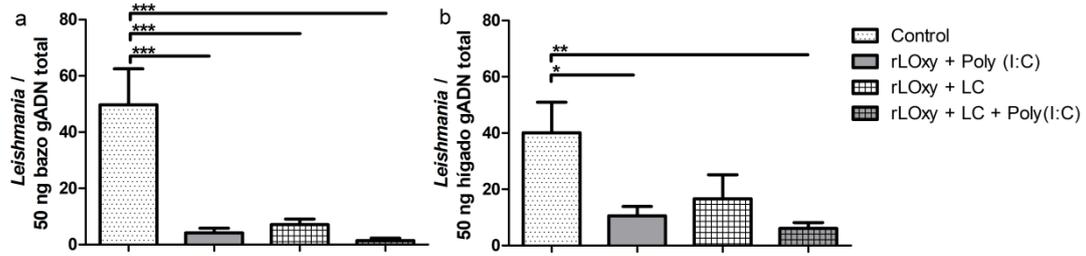


Figura 33. Ensayo de protección en animales inmunizados con vacunas de tercera generación frente a la infección por *L. infantum*. Carga parasitaria en la en bazo (a) e hígado (b) determinados mediante qPCR en tiempo real. Los datos son representados como cantidad de parásitos de *Leishmania* en 50 ng de ADN total procedente del órgano analizado. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 por ANOVA de 1 vía y *post-test* de Dunnet.



DISCUSIÓN

DISCUSION

La investigación y el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis comenzaron en el siglo XX con las vacunas de primera generación que involucran parásitos enteros muertos inactivados o vivos atenuados. A pesar de que algunas de ellas han sido evaluadas en ensayos clínicos de fase III en humanos, hasta el momento no existen vacunas aprobadas para tal fin⁽⁹⁵⁾. Sin embargo, vacunas de segunda y tercera generación son actualmente comercializadas para su aplicación en caninos⁽¹²³⁾.

Un enfoque económico y de fácil producción podría ser el uso de antígenos totales para la formulación de una vacuna⁽¹⁵⁰⁾. Por una parte, la facilidad y bajo costo de producción es un punto significativo en países de bajos ingresos donde existe mayor incidencia de esta enfermedad⁽¹⁵¹⁾. Por otra parte, el uso de una gran variedad de antígenos podría mejorar la capacidad de reconocimiento por parte del sistema inmune, dada la heterogeneidad de las moléculas del MHC en la población natural⁽¹⁵⁰⁾.

Los antígenos de *Leishmania* de primera generación han sido desarrollados empleando diversas metodologías como autoclavado⁽¹⁵²⁾, ciclos de congelamiento y descongelamiento⁽¹⁵³⁾, pasteurización⁽¹⁵⁴⁾, y sonicación⁽¹⁵⁵⁾. Sin embargo, no hay muchos estudios que comparen el perfil proteico y la respuesta inmune generados por los mismos⁽¹⁵⁶⁾.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el perfil proteico y la respuesta inmune generada por los ATLa se ven influenciados por la metodología empleada para su obtención. De esta manera, se pudo observar que los ATLa tuvieron una gran pérdida de la integridad (figura 19), similar a lo observado en otros estudios⁽¹⁵⁴⁾. El proceso de autoclavado estaría generando una destrucción casi total de las proteínas, obteniendo antígenos de muy bajo peso molecular que no se alcanzarían a observar en el gel. Ha sido ampliamente demostrado que antígenos pequeños no son buenos inmunógenos⁽¹⁵⁷⁾; por lo tanto, de acuerdo a lo esperado, las respuestas inmune humoral y celular inducidas por los ATLa fueron muy bajas (figura 20 y 21).

Por otra parte, los ATLf presentaron un perfil proteico conservado con una respuesta inmune mixta Th1:Th2:Treg marcada (figura 20 y 21, tal como fue observado en reportes previos de nuestro equipo de trabajo⁽¹⁴⁷⁾. Además, la comparación entre la integridad proteica de ATLa y ATLf fue similar a aquella observada por Convit y sus colaboradores⁽¹⁵⁴⁾. Finalmente, la integridad proteica de los ATLa y el cultivo de promastigotes fresco tuvo una notable similitud, con un perfil prácticamente inalterado (figura 19). Estos resultados indican que la sonicación de los antígenos estaría promoviendo una ruptura de las células para obtener las proteínas totales sin generar una degradación de las proteínas, mientras que el autoclavado provocaría una degradación generalizada de las mismas.

De acuerdo con los resultados observados en el gel, los ATLa produjeron una fuerte respuesta inmune humoral con mayores niveles de IgG que los demás grupos, acompañado de un incremento significativo de IgG1 y una tendencia a mayores niveles de IgG2a respecto al control (figura 20). Esta respuesta inmunológica observada podría deberse a que la presencia de una gran cantidad de proteínas de diversos tamaños permite que los ATLa tengan una marcada inmunogenicidad. Si bien la respuesta inmune humoral no puede ser relacionada directamente con la protección, la producción de IgG1 e IgG2a es dependiente de las células T⁽¹⁵⁸⁾. Además, se

ha demostrado que, durante la infección por *Leishmania*, un aumento de los niveles de IgG1 en comparación con IgG2a está asociado a una mayor progresión de la enfermedad y viceversa en modelos murinos⁽⁶¹⁾. Es por esto, que la respuesta inmune humoral inducida por ATLs debe ser mejorada con el uso de adyuvantes apropiados para generar un predominio de IgG2a vinculado a Th1.

La cuantificación de la producción de citoquinas y proliferación celular de linfocitos son diferentes metodologías para evaluar la respuesta inmune mediada por linfocitos⁽⁵⁰⁾. A pesar de que la medición de la proliferación celular en esplenocitos en respuesta a la estimulación antigénica no tiene una correlación directa con la función efectora específica de los linfocitos T, la misma es ampliamente usada para evaluar las características inmunogénicas de las proteínas⁽¹⁵⁹⁾. En el presente trabajo, se demostró que los esplenocitos estimulados, provenientes de ratones inmunizados con ATLs, tuvieron un incremento estadísticamente significativo de la proliferación celular (figura 21).

En conclusión, se pudo observar una incrementada respuesta inmune principalmente por parte de los ATLf y ATLs. Estos datos sugieren que los ATL poseen componentes todavía no identificados que son capaces de iniciar una respuesta inmune contra proteínas presentes en la mezcla antigénica sin la necesidad de incorporar adyuvantes.

Resultados previos de nuestro equipo de trabajo demostraron que los ATL, obtenidos por ciclos de congelamiento y descongelamiento, combinados con Poly (I:C) o con Montanide ISA 763 como adyuvantes fueron capaces de disminuir la manifestación clínica y carga parasitaria en ratones BALB/c luego de la infección experimental por *L. amazonensis*^(146, 147). En base a estas experiencias previas y a los nuevos resultados, se combinaron los ATL obtenidos por sonicación con Poly (I:C) para evaluar la respuesta inmune humoral y celular, así como también la protección contra la infección por *L. amazonensis* en ratones BALB/c.

A pesar de que los ATLs generaron una fuerte respuesta inmune humoral y mayores niveles de IFN- γ que el control, los mismos también indujeron mayores niveles de IgG1, IL-10 y menores de IgG2a y de IFN- γ cuando se compara con el grupo que además recibió Poly (I:C) (figuras 22 y 23). Esto se vio reflejado en el aumento de la susceptibilidad de los ratones BALB/c inoculados con ATLs frente a la infección por *L. amazonensis* (figura 26). Esta respuesta ha sido observada previamente por nuestro equipo utilizando ATLf^(146, 147); lo que indica que los ATL inducen una exacerbación de la infección independientemente de la metodología empleada. Estos resultados están de acuerdo con otros autores quienes han observado que la inmunización con antígenos totales de *L. amazonensis*, aunque no con antígenos de *L. braziliensis*, aumentan la susceptibilidad de ratones BALB/c a la infección por *L. amazonensis*⁽¹⁶⁰⁾. Al mismo tiempo, Laison y Shaw demostraron que la infección dada por especies pertenecientes al complejo *mexicana* (*L. mexicana* y *L. amazonensis*) no generó protección cruzada contra el desafío con especies del complejo *L. braziliensis* en monos. Incluso, la primera infección por *L. amazonensis* ni siquiera generó protección homóloga contra la re-infección. Sin embargo, encontraron resultados opuestos cuando el experimento fue realizado a la inversa; es decir, la primer infección por subespecies del complejo *braziliensis* generó resistencia a la infección por parásitos del complejo *mexicana*⁽¹⁶¹⁾. En ese mismo trabajo, los autores analizan la dificultad encontrada al diseñar vacunas que utilicen antígenos de *L. amazonensis*.

Del mismo modo, otros autores demostraron que promastigotes muertos de *L. amazonensis* administrados en monos Rhesus, así como ratones BALB/c por vía subcutánea o intramuscular también mostraron un incremento en la infección luego del desafío con *L. amazonensis*^(162, 163). Sin embargo, ocurrió lo contrario cuando esta vacuna fue inoculada por vía oral, demostrando que también la vía de inoculación influye en la respuesta y eficacia de una vacuna⁽¹⁶³⁾. En el mismo trabajo, los autores sugieren que el procesamiento y la presentación antigénica en la mucosa intestinal influye en la eficacia de los antígenos totales de *L. amazonensis* inoculados por vía intranasal frente a la infección por esta especie. Al mismo tiempo proponen un mecanismo de tolerancia periférica de la respuesta Th2, que favorece el incremento de IFN- γ y la protección frente a la infección, luego de la inmunización vía oral.

Otros autores sugieren que la susceptibilidad a la leishmaniosis cutánea dada por antígenos totales de *L. amazonensis* podría deberse a la presencia de serina-proteasas en los mismos, lo que promueve una incrementada producción de IL-10 y activa una respuesta del tipo Th2⁽¹⁶⁴⁾. De esta forma, el mecanismo por el cual ocurre una exacerbación de la severidad luego de la inoculación de los ATL podría estar vinculado a un establecimiento de este tipo de respuesta Th2. Al iniciar la infección primaria luego de la inoculación con ATL, la *Leishmania* podría infectar macrófagos que presentarían sus antígenos a linfocitos Th2 específicos (generados previamente por los ATL) llevando a una activación alternativa del macrófago y favoreciendo la replicación del parásito. Por el contrario, en el caso de los ratones que no fueron estimulados con ATL (grupo control), al no tener células Th2 específicas sensibilizadas previamente, la infección por *Leishmania* podría generar, por sí misma, una respuesta inmune asociada a una menor severidad. Aunque queda fuera de nuestro interés, la determinación de los perfiles Th en los animales infectados luego de la inmunización podría brindar un conocimiento más exacto sobre la generación de la respuesta inmune *post*-infección.

La formulación ATLs + Poly (I:C) logró una mayor respuesta inmune humoral y celular que los ATLs, generando a su vez un *switch* de la misma hacia el perfil Th1, con un incremento de los niveles de IgG2a, de IFN- γ y manteniendo los niveles basales de IL-10 (figuras 22 y 23). Es importante remarcar que IL-10 tiene un rol significativo en la progresión de la infección por *Leishmania*⁽¹⁶⁵⁾, por lo que bajos niveles de esta citoquina implicaría un mejoramiento en la respuesta inmune protectora. Al mismo tiempo, la formulación que contiene el Poly (I:C) indujo mayores niveles de IL-4 que el grupo que no lo posee.

Esta respuesta inmune, caracterizada por un perfil predominantemente del tipo Th1 por parte de la formulación ATLs + Poly (I:C), se ve reflejada en una reducción de la manifestación clínica luego de la infección por *L. amazonensis*, con una menor tumefacción de la almohadilla plantar que los otros grupos, una menor carga parasitaria que los animales inoculados con ATLs y menor índice esplénico que el grupo control infectado (figura 26). Estos resultados fueron similares a aquellos obtenidos previamente por nuestro equipo de trabajo en donde ATLf fueron formulados con el mismo adyuvante⁽¹⁴⁷⁾. Si bien la esplenomegalia es una respuesta inflamatoria a la infección sistémica por parte de los parásitos de *Leishmania*, se ha demostrado que una reducción del índice esplénico podría estar relacionado con una disminución de la llegada de los parásitos al bazo⁽¹⁴⁸⁾ y menor susceptibilidad a la infección⁽¹⁴⁹⁾. Aunque observamos una clara asociación entre las formulaciones con perfiles Th1 y una mejoría clínica frente a la infección, no

podemos descartar que otros factores humorales y celulares sean responsables de los resultados observados.

A pesar de que el Poly (I:C) es un gran inductor de la respuesta inmune del tipo Th1, también es una molécula algo inestable^(86, 94); es por esto que una buena estrategia para mejorar la eficacia de vacunas de primera generación sería combinarlo con otro adyuvante que permita la liberación gradual del Poly (I:C) y del antígeno, como son las soluciones oleosas del tipo Montanide, el cual mostró ser efectivo en combinación con ATLf contra la infección por *L. amazonensis*⁽¹⁴⁶⁾. La eficacia del uso de adyuvantes del tipo Montanide en vacunas de primera generación contra la leishmaniosis cutánea ha sido demostrada por otros autores, incluso con mejores resultados que al utilizar el adyuvante BCG^(166, 167). Teniendo esto en cuenta, se analizó la respuesta inmune humoral y celular, así como la protección frente a la infección por *L. amazonensis* por parte de vacunas de primera generación formuladas con ATLf o ATLS combinados con Poly (I:C) y Montanide ISA 763.

Ambas formulaciones evaluadas mostraron un incremento significativo de los niveles de anticuerpos IgG y sus isotipos (figura 24), principalmente por parte de ATLS + Poly (I:C) + Montanide ISA 763. Esta última formulación también logró un incremento de los niveles de todas las citoquinas evaluadas, aunque en términos absolutos los niveles de IFN- γ fueron muy superiores que los de IL-4 e IL-10 (figura 25), por lo que esta formulación estaría generando una respuesta inmune humoral Th1:Th2 mixta, pero celular con predominio Th1. Por su parte, la formulación ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763 logró un incremento significativo de los niveles de IL-4 y proliferación celular respecto al control, acompañado de tendencia a mayores niveles de IFN- γ e IL-10. La liberación sostenida del antígeno y de Poly (I:C) otorgada por Montanide genera diferentes respuestas inmunológicas dependiendo de la metodología empleada en la obtención de los ATL. A pesar de que estas formulaciones no generan una fuerte respuesta inmune, ambas lograron una buena protección contra la infección experimental por *L. amazonensis*, por lo que no se puede descartar que haya otros mecanismos inmunológicos implicados. De esta manera, se demuestra el efecto sinérgico en la utilización de 2 adyuvantes que presentan diferentes mecanismos de acción, para mejorar la protección frente a la infección por *Leishmania*.

Las vacunas de primera generación producen una inmunidad duradera, poseen una alta diversidad de antígenos, además de ser una estrategia de fácil producción y económica. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes, como: i) dificultad de estandarización al momento de la producción; ii) no son altamente seguras, pudiendo producir alergias debido a la presencia de la gran cantidad de moléculas no del todo caracterizadas; iii) también aquellas vacunas que involucran microorganismos atenuados o inactivados podrían volverse virulentos; iv) presentan inestabilidad y necesidad de mantener la cadena de frío; finalmente, v) la manipulación del microorganismo para su obtención podría ser inseguro para los operadores⁽⁸⁰⁾.

Paralelamente, las proteínas de tercera generación evitan algunos de los inconvenientes encontrados en las de primera generación. Sin embargo, uno de los principales aspectos que hay que tener en cuenta a la hora de producir vacunas de tercera generación es la selección del antígeno a utilizar. Esto se verá influenciado por el conocimiento que existe sobre el patógeno,

el tipo de respuesta inmunológica que genera el mismo al ingresar al organismo, la interacción parásito-hospedador-vector y la epidemiología de la enfermedad⁽¹⁶⁸⁾.

De esta manera, los patógenos como *Leishmania* expresan diferentes proteínas en cada etapa de su ciclo de vida que son importantes para el metabolismo, virulencia y patogénesis del parásito⁽⁸¹⁾. Los mecanismos inmunológicos de frente a los agentes infecciosos están estrechamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad. Es por esto, que la comprensión de los cambios inmunológicos, inmunogénicos y antigénicos asociados a la resistencia y susceptibilidad a la infección son fundamentales para la selección del antígeno durante el desarrollo de una vacuna⁽¹⁶⁹⁾.

Al mismo tiempo, el conocimiento respecto a la respuesta inmune generada por el parásito y la interacción de éste con el hospedador y con el vector, permite identificar aquellos antígenos más inmunogénicos, es decir que puedan inducir una respuesta inmunológica capaz de ser adquirida y mantenida en el tiempo por parte del hospedador⁽¹⁷⁰⁾. En el caso particular de la infección por *Leishmania*, es bien conocido el hecho de que algunas proteínas salivales presentes en el vector estimulan la infectividad por parte del parásito. Este conocimiento ha sido aplicado en el desarrollo de vacunas, demostrando que la inmunidad generada contra proteínas salivales del vector protege a ratones contra la infección por *Leishmania*⁽¹⁷¹⁾.

Existen muchos factores que pueden influir en la heterogeneidad de la respuesta inmunológica observada frente a una vacuna, como por ejemplo la existencia de una variedad de genes polimórficos relacionados a la respuesta inmune por parte del hospedador⁽¹⁷²⁾. En el caso de la leishmaniosis en particular, se ha observado que existe una correlación entre los polimorfismos de moléculas implicadas en el reconocimiento de los parásitos de *Leishmania* y posterior activación de la célula receptora, y la susceptibilidad y resistencia frente a la infección⁽¹⁷³⁾. Así, ciertas variantes alélicas presentes en las diferentes poblaciones podrían responder mejor a una formulación vacunal que otras dependiendo del antígeno utilizado, poniendo de manifiesto la importancia del conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en la selección del antígeno.

Una estrategia utilizada en los últimos años para seleccionar antígenos inmunodominantes es la utilización de metodologías proteómicas-serológicas mediante *western blot* en 2 dimensiones, empleando sueros de pacientes con leishmaniosis⁽¹⁶⁹⁾. De esta manera, se pueden detectar antígenos inmunogénicos con potencial profiláctico⁽⁸¹⁾.

En la presente tesis se realizó un análisis inmunoproteómico mediante *western blot* en 2D, donde las proteínas de *L. amazonensis* separadas en el gel fueron incubadas con un *pool* de sueros procedentes de ratones BALB/c inmunizados con una vacuna de primera generación evaluada [ATLf + Poly (I:C) + Montanide ISA 763] que generó una marcada protección frente a la infección por *L. amazonensis* (figura 27). De esta manera, se identificaron 4 proteínas inmunodominantes que podrían ser candidatas para generar vacunas de tercera generación (figura 28).

En los resultados obtenidos luego de la identificación antigénica, se observó una diferencia entre el PI teórico y experimental en algunas proteínas y también entre el peso molecular teórico y experimental particularmente en la proteína identificada en el *spot* 7, esto podría deberse a la

presencia de modificaciones *post*-traduccionales y procesamiento de las proteínas observado en *Leishmania* spp⁽¹⁷⁴⁾.

Por último, un antígeno vacunal contra *Leishmania* además de ser inmunógeno, debe estar lo más conservado posible entre las diferentes especies de *Leishmania*, lo que permitiría generar protección contra las distintas manifestaciones clínicas que presenta esta enfermedad. Al mismo tiempo, el antígeno debe ser filogenéticamente divergente a cualquier proteína humana o canina (dependiendo del hospedador en el que se aplicaría la vacuna) para no generar autoinmunidad⁽¹⁶⁸⁾. En este trabajo se demostró que las 4 proteínas identificadas por inmunoproteómica presentaron baja tasa de conservación filogenética respecto al ser humano y canes acompañado de un elevado nivel de conservación filogenética dentro de la familia Trypanomastidae y en particular del género *Leishmania* (datos no mostrados por estar bajo protección intelectual), lo cual es altamente favorable para poder utilizar las mismas en formulaciones vacunales.

Paralelamente, la proteína identificada en el *spot 7* tiene una secuencia repetitiva que podría ser favorable para su uso en el inmunodiagnóstico de la enfermedad, tal como es el antígeno K39 de *Leishmania* ampliamente empleado^(175, 176). De la misma manera, la proteína A2, antígeno empleado en la formulación de la vacuna comercial Leish-Tec®, es una proteína repetitiva que también ha sido evaluada para su utilización en el diagnóstico de la leishmaniosis humana y canina⁽¹⁷⁷⁾. El uso de proteínas repetitivas para el inmunodiagnóstico de enfermedades ha sido sugerido debido a que las mismas parecen inducir una activación de la respuesta mediada por células B y por lo tanto, resultar de preferencia para la respuesta humoral^(178, 179).

Además de la selección del antígeno a utilizar en el desarrollo de vacunas de tercera generación, hay que tener en cuenta que las proteínas recombinantes suelen ser poco inmunogénicas, por lo que es necesaria la utilización de adyuvantes eficaces.

Los liposomas catiónicos han demostrado ser altamente eficientes en mejorar la presentación antigénica por parte de las células dendríticas, principales células presentadoras de antígeno, incluso mayor que los liposomas neutros⁽¹⁸⁰⁾. Conjuntamente, la encapsulación de agonistas de TLR en liposomas catiónicos cargados con proteínas mejora la maduración de las DC por parte de los LC, además de favorecer una respuesta inmune del tipo Th1⁽¹⁸¹⁾.

Si bien los liposomas catiónicos combinados con agonistas de TLR han sido utilizados como adyuvantes para el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis, su combinación con Poly (I:C) aún no ha sido evaluada^(182, 183). Sin embargo, el adyuvante Poly (I:C) encapsulado en LC ha mostrado ser efectivo contra otras enfermedades como el cáncer⁽¹⁸⁴⁾. Por otra parte, se ha demostrado que esta combinación es capaz de inducir una fuerte respuesta de linfocitos T, principalmente del tipo citotóxica, la cual es muy importante para la protección contra parásitos intracelulares como *Leishmania*^(185, 186).

En el presente trabajo, se utilizó la proteína recombinante rLOxy de *L. infantum* en combinación con Poly (I:C) y/o encapsulada en LC, y se evaluó su protección frente a la infección por *L. amazonensis* y *L. infantum*. Esta proteína está altamente conservada entre las especies de *Leishmania*, presentando un porcentaje de cobertura entre 93 y 98% dependiendo de la especie (figura 29), por lo que podría ser un buen candidato para lograr protección heteroespecie.

Al analizar las propiedades físicas de las formulaciones liposomales (tabla 11), se pudo observar que la adición de proteína y/o adyuvante generan una disminución de los valores del potencial Z de los LC, lo cual es esperable debido a la carga negativa presentada por el Poly (I:C) y la proteína rLOxy al pH de trabajo (pH 7,2). También se observó un incremento en el diámetro y el índice de polidispersión, que podría deberse a la interacción de las proteínas y adyuvante cargados negativamente con la membrana de los liposomas cargados positivamente. Debido a que la encapsulación no es completa, proteínas y adyuvante quedan en la superficie externa, lo que podría favorecer el agregado de partículas, aumentando el índice de polidispersión observado⁽¹⁸⁷⁾. Esto podría ser favorable, ya que se ha demostrado que antígenos particulados son internalizados por fagocitosis más eficientemente que los solubles por las APC, además de activar la vía de señalización calcineurina/NFAT, lo que permite mayor niveles de estimulación inmunológica⁽¹⁸⁸⁾. Por otra parte, un incremento en el diámetro de las partículas podría ser beneficioso para el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis, ya que se ha puesto de manifiesto que un mayor tamaño de liposomas catiónicos cargados con proteínas de *Leishmania* favorece el desarrollo de una respuesta inmune del tipo Th1 con una consecuente mayor protección frente a la infección en ratones BALB/c⁽¹⁸⁹⁾.

La respuesta inmune humoral y la protección heteroespecie frente a la infección por *L. amazonensis* y *L. infantum* fue evaluada en ratones inmunizados con las vacunas de tercera generación formuladas con rLOxy combinada con Poly (I:C) como adyuvante y/o encapsulada en liposomas catiónicos como sistema de *delivery*. Solo las vacunas que contenían LC en su formulación lograron incrementar significativamente los niveles de anticuerpos IgG total e IgG1 (figura 31). A pesar de la marcada respuesta inmune humoral del tipo Th2, las 3 formulaciones evaluadas lograron una protección contra la infección por *L. infantum* (figura 33), manifestado por una reducción en la carga parasitaria. Posiblemente, la protección observada se deba a respuestas inmunológicas celulares no evaluadas. Si bien la formulación rLOxy + LC + Poly (I:C) logró reducir significativamente la lesión generada por la infección con *L. amazonensis*, no consiguió una disminución estadísticamente significativa en la carga parasitaria, la cual fue determinada por dilución límite en base 10 (figura 32). Otros autores utilizan esta misma metodología para contabilizar la presencia de parásitos en el sitio de infección, pero utilizando una dilución límite en base 5⁽¹⁹⁰⁾; esta diferencia podría permitir diferenciar estadísticamente la tendencia observada en los resultados obtenidos.

Se ha demostrado que la especie *L. amazonensis* generan un amplio espectro de manifestaciones clínicas, como la leishmaniosis cutánea localizada y difusa, mucocutánea e incluso se ha aislado de pacientes con leishmaniosis visceral^(191, 192). A diferencia de otras especies de *Leishmania* que también producen leishmaniosis tegumentaria, *L. amazonensis* lidera la infección hacia manifestaciones clínicas más severas^(191, 193). Éstas están acompañadas de cierta anergia de células T, asociada a la inhibición de la respuesta de estos linfocitos, así como un perfil inmunológico del tipo Th2, caracterizado por bajos niveles de IFN- γ y elevada IL-4⁽¹⁹³⁾. Además se ha demostrado que *L. amazonensis* inhibe la presentación antigénica mediante el clivaje de las moléculas de MHC II en las células diana⁽¹⁹³⁾. Estos mecanismos generados por la infección por *L. amazonensis* podrían explicar la ausencia de protección completa observada en los resultados de este trabajo. Así, la infección podría estar evadiendo la respuesta inmunológica lograda por las vacunas. Al mismo tiempo, podría estar generando respuestas Th2 y Treg que inhibirían la respuesta Th1 inducida por formulaciones vacunales.

Por otra parte, el estatus inmunológico y genético del hospedador tiene un rol fundamental en el resultado de la infección por *Leishmania*, demostrándose que los ratones BALB/c, así como los C57BL/10, al tener un *background* genético del tipo Th2, son altamente susceptibles a la infección por *L. amazonensis*, a diferencia de las cepas C57BL/6, C3H, DBA y CBA que presentan una resistencia parcial a la infección por esta especie de *Leishmania*⁽¹⁹³⁾.

Estas características, tanto de la especie de *Leishmania* como la cepa de ratón utilizadas en este trabajo, hacen que sea muy difícil de lograr una protección esterilizante por parte de vacunas contra la infección por *L. amazonensis*, tal como hemos observado en nuestros resultados (figura 26 y 32). Además, la cepa de *Leishmania* utilizada ha sido mantenida durante largos periodos de tiempo en ratones, lo que podría haber incrementado la virulencia contrariamente al efecto que genera el mantenimiento *in vitro* de estos parásitos⁽¹⁹⁴⁾. Esto se condice con el menor inoculo de parásitos infectivos utilizados suficientes para generar infección en comparación con el utilizado por otros autores^(142, 195).

Otros investigadores han logrado producir vacunas de primera generación formulada con antígenos totales de *L. amazonensis* que reducen la tumefacción y la carga parasitaria luego de la infección por *L. amazonensis* cuando una cepa de ratón menos susceptible como C57BL/6 es utilizada, aunque esta protección no logra ser esterilizante, es decir no se inhibe totalmente el desarrollo de la tumefacción y carga parasitaria⁽¹⁹⁶⁾.

Tanto las vacunas de primera como de tercera generación evaluadas lograron mejorar la manifestación clínica dada por la infección por *L. amazonensis*. De esta manera, las respuestas inmunológicas obtenidas parecen disminuir la inflamación local y en el bazo generada por la infección. Sin embargo, no en todos los casos hubo una protección con disminución de la carga parasitaria, es decir las formulaciones no estarían incrementando los mecanismos microbicidas en las células dianas contra esta especie de *Leishmania*.

La protección frente a la leishmaniosis visceral por parte de la proteína rLOxy ya ha sido demostrada por otros autores utilizando saponina como adyuvante, logrando disminuir la carga parasitaria en bazo e hígado de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*⁽⁸²⁾.

Por otra parte, una protección heteroespecie frente a la infección por *L. amazonensis* ha sido previamente observada por la inmunización con la proteína A2 de *L. donovani*, la cual constituye el antígeno de la vacuna comercial Leish-Tec[®]⁽¹²⁴⁾, cuando fue formulada con IL-12 recombinante, pero no así por parte del antígeno LACK en ratones BALB/c⁽¹⁴²⁾.

Aunque es necesario continuar con la investigación en este área, en el presente trabajo se ha logrado desarrollar nuevas formulaciones vacunales de diferente tecnología que son capaces de reducir la sintomatología clínica de la infección e incluso en algunos casos la carga parasitaria. Estos resultados aportan nuevos enfoques y conocimientos para el desarrollo y diseño de vacunas contra *Leishmania*.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo ha permitido dar un aporte al conocimiento sobre la identificación y obtención de distintos antígenos de *Leishmania*. Al mismo tiempo, se obtuvieron avances en la evaluación de la respuesta inmune inducida por los antígenos obtenidos en combinación con adyuvantes como agonista de TLR-3, emulsión agua en aceite y liposomas catiónicos, con el fin de obtener vacunas que protejan frente a la infección por *Leishmania*.

Se puede concluir que la forma de obtención de los antígenos de *L. amazonensis* influye en el perfil proteico de los mismos y su inmunogenicidad evaluada en ratones. De esta manera, el sonicado es la metodología que permite obtener antígenos con una mayor integridad proteica y que inducen una mayor respuesta inmunológica.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de vacunas de primera generación permiten concluir que aquellas formuladas con ATLf o ATLS en combinación con Poly (I:C) y/o Montanide ISA 763 generan respuestas inmunológicas capaces de lograr una protección parcial frente a la infección experimental con *L. amazonensis*.

A partir del análisis inmunoproteómico efectuado, se puede concluir que las proteínas identificadas podrían ser empleadas como antígenos en formulaciones vacunales de tercera generación contra la leishmaniosis.

La vacuna de tercera generación formulada con la proteína rLOxy de *L. infantum* y Poly (I:C), encapsulados en liposomas catiónicos induce una respuesta inmune protectora contra la infección por *L. infantum*, capaz de mejorar la manifestación clínica dada por *L. amazonensis* en ratones BALB/c.

Todos los resultados obtenidos en su conjunto indican que las formulaciones ensayadas podrían ser candidatos vacunales contra la leishmaniosis para su uso en humanos y/o caninos, luego de demostrar que las mismas sean seguras en el modelo ensayado.



PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

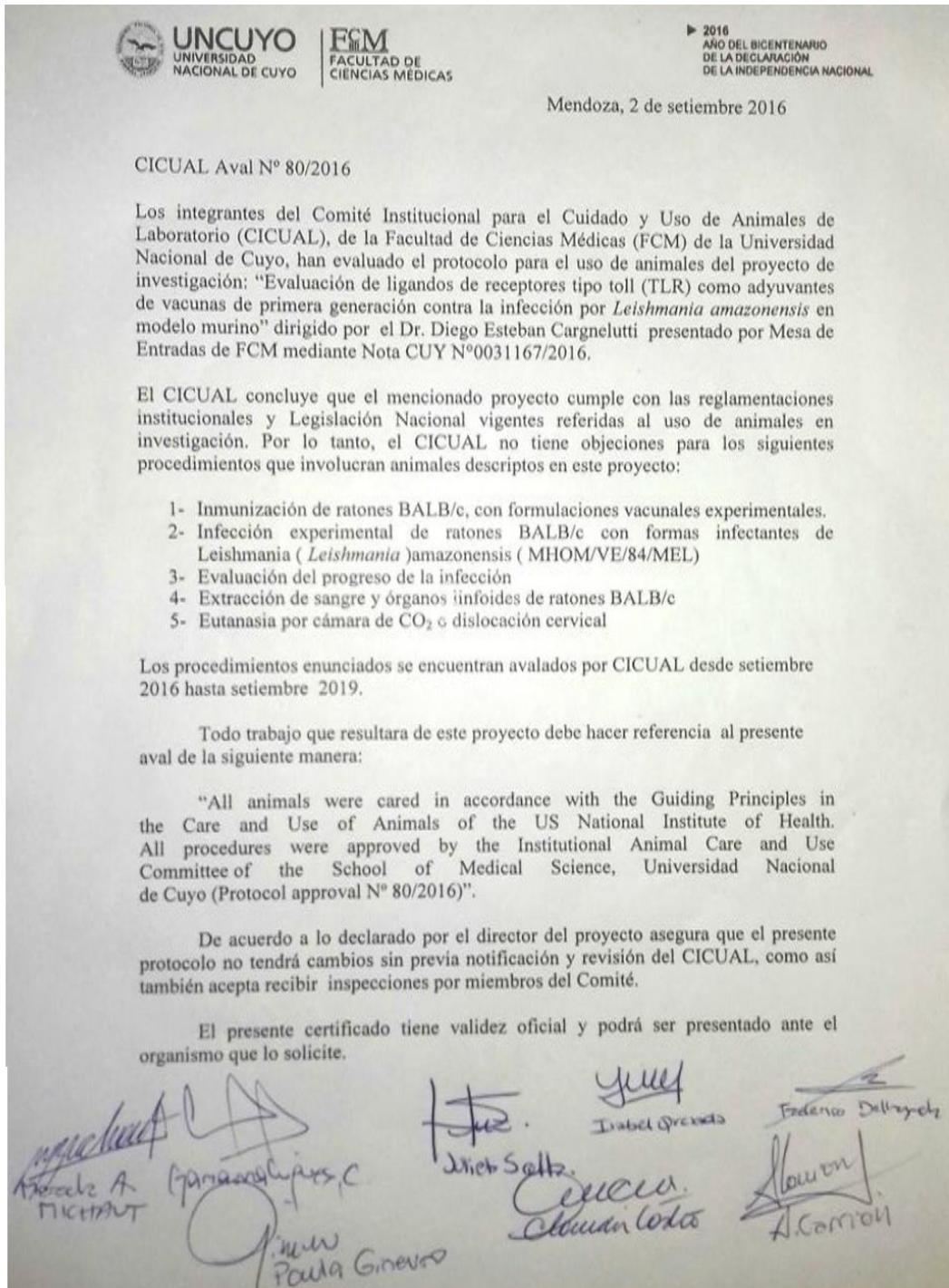
-Realizar un análisis más detallado de la respuesta inmune generada por las vacunas ensayadas, con el fin de conocer con más precisión el mecanismo de acción de las mismas.

-Efectuar estudios de seguridad de las vacunas ensayadas en el modelo murino utilizado en la presente tesis.

-Obtener las proteínas identificadas por inmunoproteómica para evaluarlas en formulaciones vacunales de tercera generación.

-Evaluar la seguridad, inmunogenicidad y protección de las formulaciones vacunales en modelos caninos y en ensayos clínicos en humanos.

ANEXO





REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. OMS. Control de la leishmaniasis. Ginebra; 2010. Contract No.: 949.
2. Molyneux D. Neglected tropical diseases. *Community Eye Health*. 2013;26(82):21-4.
3. Conteh L, Engels, T., Molyneux, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*. 2010;375(9710):239-47.
4. Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2959-63.
5. Oliveira CD, Assuncao RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*. 2001;17(5):1231-9.
6. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
7. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1:S1.
8. Savioli L DD. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases World Health Organization; 2013.
9. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. 2013.
10. Germanó MJ SM, Neira G, Lozano E, Mackern-Oberti JP, Cargnelutti DE. Leishmaniasis in the Argentine Republic: Temporal and geographical distribution from 2013 to 2017. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2019;12(7):300-5.
11. Salomón OD QM, Rosa JR. Ecoepidemiología de la leishmaniasis cutánea en Argentina. *Salud (i) Ciencia*. 2008;16(5):514-20.
12. Quintana MG, Fernandez MS, Salomon OD. Distribution and abundance of phlebotominae, vectors of leishmaniasis, in Argentina: spatial and temporal analysis at different scales. *J Trop Med*. 2012;2012:652803.
13. Pizzi HL TA, Ferrero MR, Pizzi HL, Fernández GL, Furey F, Pizzi RD, Herrero M, Dib MD. El inexorable avance de la Leishmaniasis: comunicación del primer caso autóctono de la Provincia de Córdoba. *Revista de Salud Pública*. 2015;19(2):15-23.
14. Salomón OD OP, Quintana MG, Pérez S, Sosa Estani S, Acardi S, Lamfri M. Transmisión de la Leishmaniasis tegumentaria en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006;66(3):211-9.
15. Garcia Bustos MF, Gonzalez-Prieto G, Ramos F, Mora MC, Hashiguchi Y, Parodi C, et al. Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. *Acta Trop*. 2016;154:125-32.
16. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1-109.
17. Alemayehu B AM. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*. 2017;11(4):519.
18. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*. 2003;33(10):1027-34.
19. Sunter J, Gull K. Correction to 'Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding'. *Open Biol*. 2018;8(8).
20. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27(2):123-47.
21. Claborn DM. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(2):127-34.
22. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017;6:750.

23. Dostalova A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5:276.
24. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004;430(6998):463-7.
25. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):601-9.
26. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-15.
27. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811-27.
28. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e584.
29. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003;31(3):174-7.
30. Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2007;46(2):132-42.
31. García-Almagro D. Leishmaniasis cutánea. *Actas dermo-sifiliográficas*. 2005;96(1):1-25.
32. Chaudhary RG, Bilimoria FE, Katare SK. Diffuse cutaneous leishmaniasis: co-infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74(6):641-3.
33. Cuba C. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2000;17(1-4):39-52.
34. Pérez C SY, Rodríguez G. Leishmaniasis cutánea difusa en un paciente con sida. *Biomédica*. 2006;24(4):485-97.
35. Zijlstra EE. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit Vectors*. 2016;9:464.
36. Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:805108.
37. Cargnelutti DE, Borremans CG, Tonelli RL, Carrizo LC, Salomon MC. Diagnosis of Leishmania infection in a nonendemic area of South America. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49(5):809-12.
38. Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):294-305.
39. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. *Microb Pathog*. 2005;38(4):147-60.
40. Loeuillet C, Banuls AL, Hide M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit Vectors*. 2016;9:144.
41. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6748-53.
42. Rochael NC, Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia e Souza LF, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Sci Rep*. 2015;5:18302.
43. Chagas AC, Oliveira F, Debrabant A, Valenzuela JG, Ribeiro JM, Calvo E. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases Leishmania parasite survival in neutrophils and inhibits X1la contact activation in human plasma. *PLoS Pathog*. 2014;10(2):e1003923.
44. Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000755.

45. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*. 2006;203(1):177-88.
46. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007;26(4):519-31.
47. Cummings HE, Tuladhar R, Satoskar AR. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:294389.
48. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:83.
49. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012;28(8):335-44.
50. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed: Elsevier; 2014.
51. Gallego C, Golenbock D, Gomez MA, Saravia NG. Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infect Immun*. 2011;79(7):2871-9.
52. Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-γ-primed macrophages. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):411-20.
53. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011;331(6018):775-8.
54. Reinhard K, Huber M, Lohoff M, Visekruna A. The role of NF-κB activation during protection against *Leishmania* infection. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(4-5):230-5.
55. Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Muller W, et al. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003476.
56. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 2001;166(2):1141-7.
57. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001;194(10):1497-506.
58. Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol*. 2003;171(7):3705-10.
59. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004;200(2):201-10.
60. Margaroni M, Agallou M, Athanasiou E, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, et al. Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble *Leishmania* antigens and modified with a TNFα-mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:6169-84.
61. Rostamian M, Sohrabi S, Kavosifard H, Niknam HM. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(2):160-6.
62. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):248-57.
63. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Parasitol Res*. 2012;2012:165126.
64. Veras PS, Bezerra de Menezes JP. Using Proteomics to Understand How *Leishmania* Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).

65. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med*. 2012;2012:819512.
66. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013;82:155-84.
67. Mathur RK, Awasthi A, Wadhone P, Ramanamurthy B, Saha B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med*. 2004;10(5):540-4.
68. Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. Leishmania major amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect Immun*. 2004;72(5):2582-9.
69. Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, Singh P, et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31551.
70. Contreras I, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001148.
71. Pinheiro Jr NF, Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, dos-Santos WL. Leishmania infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun*. 2006;74(7):3912-21.
72. Tiunan TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011;15(8):e525-32.
73. de Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras PS. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:815023.
74. Ellis M, Bernsen R, Ali-Zadeh H, Kristensen J, Hedstrom U, Poughias L, et al. A safety and feasibility study comparing an intermittent high dose with a daily standard dose of liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 11):1474-85.
75. Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1478-83.
76. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(4):419-33.
77. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002;18(9):399-405.
78. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R. Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *Int J Prev Med*. 2019;10:95.
79. Bagnoli F, Baudner B, Mishra RP, Bartolini E, Fiaschi L, Mariotti P, et al. Designing the next generation of vaccines for global public health. *OMICS*. 2011;15(9):545-66.
80. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*. 2016;7(2):842-54.
81. Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chavez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like Leishmania using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):e1430.
82. Martins VT, Chavez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavaci AM, Martins AM, Lage PS, et al. Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2148.
83. Martins VT, Chavez-Fumagalli MA, Lage DP, Duarte MC, Garde E, Costa LE, et al. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania infantum against Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137683.
84. Lanza JS, Vucen S, Flynn O, Donadei A, Cojean S, Loiseau PM, et al. A TLR9-adjuvanted vaccine formulated into dissolvable microneedle patches or cationic liposomes protects against leishmaniasis after skin or subcutaneous immunization. *Int J Pharm*. 2020;586:119390.
85. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*. 2015;15(2):51-7.

86. Toussi DN, Massari P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. *Vaccines (Basel)*. 2014;2(2):323-53.
87. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol*. 2013;4:214.
88. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol*. 2018;39:14-21.
89. Hu J, Chen Z, Gu J, Wan M, Shen Q, Kieny MP, et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, Plasmodium falciparum AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS One*. 2008;3(4):e1952.
90. Cox SJ, Aggarwal N, Statham RJ, Barnett PV. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine*. 2003;21(13-14):1336-47.
91. Levast B, Awate S, Babiuk L, Mutwiri G, Gerdt V, van Drunen Littel-van den Hurk S. Vaccine Potentiation by Combination Adjuvants. *Vaccines (Basel)*. 2014;2(2):297-322.
92. Askarizadeh A, Jaafari MR, Khamesipour A, Badiie A. Liposomal adjuvant development for leishmaniasis vaccines. *Ther Adv Vaccines*. 2017;5(4-5):85-101.
93. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*. 2012;30(13):2256-72.
94. Martins KA, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(3):447-59.
95. Mohebbali M, Nadim A, Khamesipour A. An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines. *Acta Trop*. 2019;200:105173.
96. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):229-43.
97. Armijos RX WM, Aviles H, Maldonado R, Racines J. Field Trial of a Vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis in an At-Risk Child Population: Safety, Immunogenicity, and Efficacy during the First 12 Months of Follow-Up. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(5):1352-7.
98. Antunes CMF MW, Magalhaes PA, Costa A, Melo MN, Dias M, Michalick MSM, Williams P, Lima AO, Vieira BF, Schetini APM. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Epidemiology*. 1986;15:572-80.
99. Marzochi KB MM, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93:205-12.
100. Castes M, Blackwell J, Trujillo D, Formica S, Cabrera M, Zorrilla G, et al. Immune response in healthy volunteers vaccinated with killed leishmanial promastigotes plus BCG. I. Skin-test reactivity, T-cell proliferation and interferon-gamma production. *Vaccine*. 1994;12:1041-51.
101. Castes M, Moros Z, Martinez A, Trujillo D, Castellanos PL, Rondon AJ, et al. Cell-mediated immunity in localized cutaneous leishmaniasis patients before and after treatment with immunotherapy or chemotherapy. *Parasite Immunology*. 1989;11:211-22.
102. Cabrera M, Blackwell JM, Castes M, Trujillo D, Convit J, Shaw MA. Immunotherapy with live BCG plus heat killed Leishmania induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunology*. 2000;22:73-9.
103. Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, et al. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet*. 1987;1(8530):401-5.
104. Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardi ME, et al. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1989;160(1):104-15.
105. Velez ID, del Pilar Agudelo S, Arbelaez MP, Gilchrist K, Robledo SM, Puerta JA, et al. Safety and immunogenicity of a killed Leishmania (L.) amazonensis vaccine against cutaneous

leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(6):698.

106. Velez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(8):593-8.

107. Momeni AZ JT, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasseri K, Godal T, Smith PG, Modabber F. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*. 1999;17:466–72.

108. Sharifi I FA, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MRA, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *The Lancet*. 1998;351(9115):1540-3.

109. NIAID NloAaID. Safety and Immunogenicity of a Vaccine for Cutaneous Leishmaniasis Using Recombinant Human Interleukin-12 and Aluminum Hydroxide Gel as Adjuvants 2008 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001906?term=vaccine&cond=leishmaniasis&draw=3&rank=13>].

110. Gicheru MM, Olobo JO, Anjili CO, Orago AS, Modabber F, Scott P. Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect Immun*. 2001;69(1):245-51.

111. Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2011;29(19):3531-7.

112. Llanos-Cuentas A, Calderon W, Cruz M, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis. *Vaccine*. 2010;28(46):7427-35.

113. Llanos-Cuentas A PF. A Phase 1, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalating Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Leish-111f + MPL-SE Vaccine in Combination With Pentavalent Antimony in Treatment of Mucosal Leishmaniasis 2006 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00111514>].

114. Nascimento E, Fernandes DF, Vieira EP, Campos-Neto A, Ashman JA, Alves FP, et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2010;28(40):6581-7.

115. Piazza F. A Phase 2, Randomized, Open-Label, Controlled Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Immunogenicity of the LEISH-F2 + MPL-SE Vaccine in the Treatment of Patients With Cutaneous Leishmaniasis 2013 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309>].

116. NIAID NloAaID. A Phase 1 Clinical Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Vaccine Candidates LEISH-F3 + GLA-SE, LEISH-F3 + MPL-SE, and LEISH-F3 + SE in Healthy Adult Subjects 2017 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01751048>].

117. Coler RN, Duthie MS, Hofmeyer KA, Guderian J, Jayashankar L, Vergara J, et al. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clin Transl Immunology*. 2015;4(4):e35.

118. Kaye P MA. A Phase IIa Safety Study to Assess the Safety and Immunogenicity of a New *Leishmania* Vaccine Candidate ChAd63-KH 2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02894008?term=vaccine&cond=leishmaniasis&draw=2&rank=10>].

119. Kaye P WR. A Phase II Study to Assess the Safety and Efficacy of the Leishmania Vaccine ChAd63-KH for the Prevention of Post-kala Azar Dermal Leishmaniasis 2019 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04107961?term=vaccine&cond=leishmaniasis&draw=2&rank=2>].
120. Kaye P WR. A Phase IIb Study to Assess the Safety, Efficacy and Immunogenicity of the Leishmania Vaccine ChAd63-KH in Post-kala Azar Dermal Leishmaniasis 2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03969134?term=vaccine&cond=leishmaniasis&draw=2&rank=7>].
121. Osman M, Mistry A, Keding A, Gabe R, Cook E, Forrester S, et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):e0005527.
122. Mayrink W, da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73(4):385-7.
123. Velez R, Gallego M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop Med Int Health*. 2020;25(5):540-57.
124. Regina-Silva S, Feres AM, Franca-Silva JC, Dias ES, Michalsky EM, de Andrade HM, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec(R) vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*. 2016;34(19):2233-9.
125. Grimaldi Jr G, Teva A, Dos-Santos CB, Santos FN, Pinto ID, Fux B, et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec(R) vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185438.
126. Testasica MC, dos Santos MS, Machado LM, Serufo AV, Doro D, Avelar D, et al. Antibody responses induced by Leish-Tec(R), an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Vet Parasitol*. 2014;204(3-4):169-76.
127. Fernandez Cotrina J, Iniesta V, Monroy I, Baz V, Hugnet C, Maranon F, et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend(R) against canine leishmaniasis. *Vaccine*. 2018;36(15):1972-82.
128. Carcelen J, Iniesta V, Fernandez-Cotrina J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I, et al. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*. 2009;27(43):5964-73.
129. Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two leishmania infantum transmission seasons. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3213.
130. Bongiorno G, Paparccone R, Foglia Manzillo V, Oliva G, Cuisinier AM, Gradoni L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish(R)) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol*. 2013;197(3-4):691-5.
131. Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1683.
132. Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, 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(46):5888-95.
133. Moreno J, Vouldoukis I, Schreiber P, Martin V, McGahie D, Gueguen S, et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Vet Immunol Immunopathol*. 2014;158(3-4):199-207.
134. Starita C, Gavazza A, Lubas G. Hematological, Biochemical, and Serological Findings in Healthy Canine Blood Donors after the Administration of CaniLeish(R) Vaccine. *Vet Med Int*. 2016;2016:4601893.
135. Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine

(CaniLeish(R)) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res.* 2014;45:69.

136. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.

137. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology.* 1984;2:979-84.

138. Zadi B, Gregoriadis G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. *Journal of Liposome Research.* 2000;10:73-80.

139. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

140. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 1977;83(2):346-56.

141. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

142. Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2003;71(7):3988-94.

143. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1666-9.

144. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1026:139-43.

145. Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhaes RD, Diniz JL, Costa LE, et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(11):1187-96.

146. Cargnelutti DE, Salomon MC, Celedon V, Garcia Bustos MF, Morea G, Cuello-Carrion FD, et al. Immunization with antigenic extracts of *Leishmania* associated with Montanide ISA 763 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(1):24-32.

147. Sanchez MV, Elicabe RJ, Di Genaro MS, Germano MJ, Gea S, Garcia Bustos MF, et al. Total *Leishmania* antigens with Poly(I:C) induce Th1 protective response. *Parasite Immunol.* 2017;39(11).

148. Fecchio CJ, Soares AM, de Oliveira SL, Sartori A. Experimental visceral leishmaniasis in high and low antibody-producer mice (selection IV-A). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(3):229-34.

149. Cargnelutti DE, Salomon MC, Celedon V, Cuello-Carrion FD, Gea S, Di Genaro MS, et al. Impact of tumor necrosis factor receptor p55 deficiency in susceptibility of C57BL/6 mice to infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(2):271-5.

150. Tahamtan A, Charostad J, Hoseini Shokouh SJ, Barati M. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine.* 2017;5(3):e12315

151. Sunyoto T, Boelaert M, Meheus F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019;17(1):57-69.

152. Tafaghodi M, Khamesipour A, Jaafari MR. Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres encapsulated with autoclaved *Leishmania major* (ALM) and CpG-ODN. *Parasitol Res.* 2011;108(5):1265-73.

153. Thakur A, Kaur H, Kaur S. Studies on the protective efficacy of freeze thawed promastigote antigen of *Leishmania donovani* along with various adjuvants against visceral leishmaniasis infection in mice. *Immunobiology.* 2015;220(9):1031-8.

154. Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, Mazzedo MI, et al. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):57-62.
155. Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, Braga SL, Correa-Oliveira R, et al. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*. 2012;7(11):e49780.
156. Arjmand R, Fard SS, Saberi S, Tolouei S, Khamesipour A, Hejazi SH. Antigenic profile of heat-killed versus thimerosal-treated *Leishmania major* using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Adv Biomed Res*. 2015;4:128.
157. Crumpton MJ. Protein antigens: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. In: Elsevier, editor. *The antigens*. II: Academic Press; 1974. p. 1-78.
158. Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2010;26(7):341-9.
159. Lagerqvist N, Naslund J, Lundkvist A, Bouloy M, Ahlm C, Bucht G. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs. *Virology*. 2009;6:6.
160. Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect*. 2005;7(13):1317-23.
161. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J Trop Med Hyg*. 1977;80(2):29-35.
162. Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 1999;163(8):4481-8.
163. Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infect Immun*. 2004;72(8):4521-7.
164. de Matos Guedes HL, Pinheiro RO, Chaves SP, De-Simone SG, Rossi-Bergmann B. Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. *Vaccine*. 2010;28(33):5491-6.
165. Firmino-Cruz L, Ramos TD, da Fonseca-Martins AM, Maciel-Oliveira D, Oliveira-Silva G, Pratti JES, et al. Immunomodulating role of IL-10-producing B cells in *Leishmania amazonensis* infection. *Cell Immunol*. 2018;334:20-30.
166. Mutiso JM, Macharia JC, Kariuki TM, Gicheru MM. Montanide ISA 720 is more effective than BCG as an adjuvant for *Leishmania* killed vaccine in BALB/c mice. *Int J Integ Biol*. 2009;7(2):107-16.
167. Mutiso JM, Macharia JC, Mutisya RM, Taracha E. Subcutaneous immunization against *Leishmania major* - infection in mice: efficacy of formalin-killed promastigotes combined with adjuvants. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(2):95-100.
168. Cunningham AL, Garcon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupeze B, et al. Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*. 2016;34(52):6655-64.
169. Das A, Ali N. Vaccine Development Against *Leishmania donovani*. *Front Immunol*. 2012;3:99.
170. Mahanty S, Prigent A, Garraud O. Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens. *BMC Immunol*. 2015;16:31.
171. Reed SG, Coler RN, Mondal D, Kamhawi S, Valenzuela JG. *Leishmania* vaccine development: exploiting the host-vector-parasite interface. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(1):81-90.

172. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. Vaccine immunogenetics: bedside to bench to population. *Vaccine*. 2008;26(49):6183-8.
173. Sanchez Luquez KY, Zerpa O, Paz-Villarraga CA, Fernandez-Mestre M. Genetic variability of molecules involved in the disease pathogenesis in Leishmania infection. *Exp Parasitol*. 2020;218:108007.
174. Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummelsmith J, Papadopoulou B, Ouellette M. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in Leishmania infantum. *J Proteome Res*. 2010;9(8):3842-53.
175. Singh OP, Sundar S. Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. *J Parasitol Res*. 2015;2015:239469.
176. Magalhaes FB, Castro Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM, Lima Neto AS, et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184867.
177. Akhoundi B, Mohebbali M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of Leishmania infantum. *Exp Parasitol*. 2013;133(3):307-13.
178. Goto Y, Coler RN, Guderian J, Mohamath R, Reed SG. Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of Leishmania infantum tandem repeat proteins. *Infect Immun*. 2006;74(7):3939-45.
179. Folgueira C, Martinez-Bonet M, Requena JM. The Leishmania infantum PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. *BMC Res Notes*. 2010;3:13.
180. Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, et al. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*. 2011;3(5):2307-14.
181. Bal SM, Hortensius S, Ding Z, Jiskoot W, Bouwstra JA. Co-encapsulation of antigen and Toll-like receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine*. 2011;29(5):1045-52.
182. Heravi Shargh V, Jaafari MR, Khamesipour A, Jalali SA, Firouzmand H, Abbasi A, et al. Cationic liposomes containing soluble Leishmania antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2012;111(1):105-14.
183. Das A, Ali N. Combining cationic liposomal delivery with MPL-TDM for cysteine protease cocktail vaccination against Leishmania donovani: evidence for antigen synergy and protection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3091.
184. Wang C, Zhuang Y, Zhang Y, Luo Z, Gao N, Li P, et al. Toll-like receptor 3 agonist complexed with cationic liposome augments vaccine-elicited antitumor immunity by enhancing TLR3-IRF3 signaling and type I interferons in dendritic cells. *Vaccine*. 2012;30(32):4790-9.
185. Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, et al. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol*. 2006;176(12):7335-45.
186. Varypataki EM, van der Maaden K, Bouwstra J, Ossendorp F, Jiskoot W. Cationic liposomes loaded with a synthetic long peptide and poly(I:C): a defined adjuvanted vaccine for induction of antigen-specific T cell cytotoxicity. *AAPS J*. 2015;17(1):216-26.
187. Sousa Lanza J. Nanostructured devices based on liposomes and dissolvable microneedles for vaccination with recombinant proteins against leishmaniasis. Belo Horizonte, Brazil: Universidade Federal De Minas Gerais; 2017.
188. Snapper CM. Distinct Immunologic Properties of Soluble Versus Particulate Antigens. *Front Immunol*. 2018;9:598.
189. Badiie A, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Shargh VH, Kheiri MT, et al. The role of liposome size on the type of immune response induced in BALB/c mice against leishmaniasis: rgp63 as a model antigen. *Exp Parasitol*. 2012;132(4):403-9.

190. Zanin FH, Coelho EA, Tavares CA, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, Rezende SA, et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1070-7.
191. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31(8):423-31.
192. de Souza MC, de Assis EA, Gomes RS, Marques da Silva Ede A, Melo MN, Fietto JL, et al. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop.* 2010;115(3):262-9.
193. Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):239-55.
194. Moreira D, Santarem N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(1):e1469.
195. Pinto EF, de Mello Cortezia M, Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 2003;21(25-26):3534-41.
196. Pratti JE, Ramos TD, Pereira JC, da Fonseca-Martins AM, Maciel-Oliveira D, Oliveira-Silva G, et al. Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57Bl/6 mice. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):534.