



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación de las vías de administración intramuscular e
intradérmica para una vacuna profiláctica de NH-36r contra
Leishmania mexicana en ratones BALB/c

Tesis presentada por:

IBQ. Bárbara Carolina Arias Argáez

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Director de Tesis:

Dr. Eric Dumonteil

Mérida, Yucatán, Enero 2017



Oficio: PICSA/009/17.
Enero 16 de 2017.

AUTORIZACIÓN PARA IMPRESIÓN DE TESIS

La tesis, "**Evaluación de las vías de administración intramuscular e intradérmica para una vacuna profiláctica de NH-36r contra Leishmania mexicana en ratones BALB/c**", presentada por la **IBQ. BÁRBARA CAROLINA ARIAS ARGÁEZ**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes de acuerdo a formato establecido.

Atentamente

Dra. Norma Elena Pérez Herrera
Coordinadora del Programa Institucional
en Ciencias de la Salud



Ccp. Archivo

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Primeramente, quiero agradecer a mi asesor el Dr Eric Dumonteil, el haberme abierto las puertas del laboratorio de parasitología, y haber confiado en mí, permitiéndome trabajar por primera vez en esta área, además, agradezco grandemente su apoyo y dirección, lo cual ha sido fundamental en la realización de este trabajo de tesis.

Mi agradecimiento, también va dirigido a mi comité tutorial, formado por el Dr. Víctor Arana, Dr. Iván Rodríguez, la M. en C. Erika Sosa y el Dr. Rolffy Ortiz por su tiempo, esfuerzo y valiosa dirección en este trabajo.

Quisiera agradecerle al Dr. Miguel Rosado, por ser un guía, agradezco su motivación, dedicación, asesoría, así como cada uno de sus consejos que, sin duda alguna tienen un lugar muy especial para mí.

Asimismo, agradezco a mis compañeros de maestría y de laboratorio Víctor Dzul y Christian Teh, su ayuda, motivación, pero sobre todo su amistad, fue muy grato poder compartir esta etapa a lado de excelentes personas.

Gracias al Dr. Vladimir Cruz, la Dra. Liliana Villanueva, y el M. en C. Pedro Martínez, por sus conocimientos, tiempo, apoyo y orientación durante mi trabajo.

Quiero agradecerle al Br. Rodrigo Chablé, su entusiasmo y ayuda en la parte experimental de este trabajo de tesis.

Finalmente, agradezco a mis compañeros del laboratorio de parasitología, por su motivación durante todo este tiempo, lo cual ha sido parte importante en la realización de esta tesis, estoy muy agradecida por formar parte de este gran equipo.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Parasitología perteneciente al Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán. Forma parte del proyecto “Iniciativa Slim para el desarrollo de vacunas contra la pobreza”, con No. de registro SISTPROY CIRB-2012-00001 y financiado por el Instituto Carlos Slim de la Salud.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
III.	ANTECEDENTES	5
3.1	Leishmaniasis	5
3.2	Manifestaciones clínicas.....	5
3.3	Leishmaniasis en México	6
3.4	Ciclo biológico del parásito	7
3.5	Respuesta inmune a <i>Leishmania</i>	8
3.6	Tratamientos para la leishmaniasis	12
3.7	Vacunas contra la leishmaniasis.....	13
3.7.1	Adyuvantes	16
3.7.2	Vacunas recombinantes contra la leishmaniasis.....	20
3.7.2.1.	Hidrolasa de nucleósidos de <i>Leishmania (L.) donovani</i> (NH36).....	22
3.8	Vías de administración de vacunas.....	26
3.8.1	Vías de administración en la piel	27
3.8.2	Vía intramuscular.....	32
3.8.3	Efecto de las vías de administración en las vacunas	33
IV.	OBJETIVO.....	36
V.	HIPÓTESIS	37
VI.	METODOLOGÍA	38
6.1	Tipo de estudio	38
6.2	Diseño experimental	38
6.3	Grupos experimentales.....	40
6.4	Definición de las variables y escalas de medición	42
6.5	Obtención de la vacuna.....	43
6.6	Animales de experimentación	43

6.7	Inmunización	44
6.8	Determinación de los niveles de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a específicos de NH36r.....	44
6.9	Aislamiento de esplenocitos de ratón.....	46
6.10	Estimulación <i>in vitro</i> de esplenocitos con NH36r	47
6.11	Determinación de linfocitos T antígeno-específicos productores de IFN- γ e IL-4	47
6.12	Infección experimental con <i>Leishmania (L.) mexicana</i>	49
6.13	Evaluación del desarrollo de la lesión.....	50
6.14	Determinación de la carga parasitaria.....	50
6.15	Análisis estadístico.....	51
6.16	Consideraciones éticas.....	51
VII.	RESULTADOS.....	52
7.1	Efecto de la vía de administración de NH36r en la inducción de la respuesta inmune humoral	52
7.2	Efecto de la vía de administración de NH36r en la frecuencia de linfocitos T antígeno-específicos productores de IFN- γ e IL-4.....	56
7.3	Efecto de la vía de administración de NH36r en la protección a una infección por <i>Leishmania (L.) mexicana</i>	61
VIII.	DISCUSIÓN.....	66
IX.	CONCLUSIONES.....	72
X.	PERSPECTIVAS	73
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

I. RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad que provoca una alta morbilidad y mortalidad en el mundo, para la cual los fármacos disponibles tienen una elevada toxicidad. Además, aún no se cuenta con una vacuna aprobada en humanos. Es importante la evaluación de factores que permitan incrementar la eficacia de las vacunas, como por ejemplo, la vía de administración, ya que se ha demostrado su influencia en la inmunogenicidad y efecto protector inducido. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de las vías de administración intradérmica e intramuscular del antígeno recombinante hidrolasa de nucleósidos de *Leishmania (L.) donovani* (NH36r) formulado con adyuvantes derivados de lípido A, en la inducción de una respuesta inmune protectora a una infección por *Leishmania (L.) mexicana* en ratones BALB/c. Se evaluó la inmunogenicidad inducida por las vías de administración de las formulaciones de vacuna, por medio de la determinación de niveles de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a, así como las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4. Los ratones fueron infectados vía subcutánea (s.c) en el cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de la cepa *Leishmania (L.) mexicana* (MHET/MX/97/Hd18), el efecto protector inducido se analizó mediante la medición del desarrollo de la lesión por 13 semanas y de la carga parasitaria. Los resultados indican que la vía intradérmica favorece una respuesta T_H2, debido a que fue capaz de inducir una mayor producción de anticuerpos IgG1 y linfocitos T CD8⁺ productores de IL-4, cuando NH36r se formuló con glucopiranosil lípido A en emulsión estable (GLA-SE) y E6020-SE, respectivamente. Mientras que la aplicación vía intramuscular del antígeno más GLA-SE se asoció a un perfil T_H1, al obtenerse una proporción de IgG2a/IgG1 significativamente mayor que por vía intradérmica. De tal forma que en el presente estudio, se encontró que la vía de administración modula la respuesta inmune. Después del reto con *Leishmania (L.) mexicana*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las rutas de administración de NH36r más E6020-SE o monofosforil lípido A (MLA), al evaluar el desarrollo de la lesión y la carga parasitaria, de tal forma que tanto la vía

intradérmica como intramuscular, pueden ser consideradas en los procesos de inmunización.

II. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es el conjunto enfermedades provocadas por parásitos intracelulares del género *Leishmania*. Dependiendo de la especie del parásito y de la respuesta inmune del hospedero, las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser desde lesiones cutáneas y mucocutáneas hasta formas viscerales. Es considerada por la Organización Mundial de la Salud un problema de salud pública no controlada y emergente, que afecta principalmente a las poblaciones más pobres y que provoca una alta morbilidad y mortalidad en el mundo. Particularmente, en México es endémica y se presenta comúnmente como leishmaniasis cutánea localizada, siendo el principal agente causal la especie *Leishmania (L.) mexicana*.^{1,2}

Las alternativas farmacológicas son escasas y resultan tóxicas. Esto, aunado al surgimiento de cepas resistentes, hace evidente la necesidad del desarrollo de vacunas para la prevención y control de esta enfermedad. Hasta la fecha, no se cuenta con una vacuna efectiva, sin embargo, diversos antígenos han demostrado ser prometedores, como NH36, cuyo uso como vacuna recombinante ha demostrado inducir protección contra diferentes especies de *Leishmania*.³⁻⁶

Por otro lado, es importante analizar aquellos factores que pudieran tener un impacto en la inmunogenicidad de las vacunas, como por ejemplo, la vía de administración, ya que puede influir en la intensidad y tipo de respuesta inducida, así como en su efecto protector.⁷⁻¹⁰

Cada sitio de inmunización tiene distintas propiedades anatómicas e inmunológicas, la administración intramuscular (i.m) es la más usada en los programas de vacunación, se ha preferido sobre otras rutas por su facilidad de técnica y por provocar reacciones adversas mínimas en el lugar de inyección.¹¹

Por su parte, la piel se ha destacado como un órgano atractivo para la administración de vacunas, por albergar células presentadoras de antígeno (CPAs) especializadas, además, algunas de estas células son capaces de activar

directamente a LT CD8⁺, por lo que se ha propuesto como un sitio recomendable para vacunas contra patógenos intracelulares.¹²

Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluará y comparará la eficacia de la administración intradérmica (i.d) e i.m de la proteína recombinante NH36 formulada con los adyuvantes derivados de lípido A, en la inducción de una respuesta inmune protectora a una infección por *L. (L.) mexicana*.

III. ANTECEDENTES

3.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es el término referido al conjunto de enfermedades en humanos y animales provocadas por diversas especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Aproximadamente se han descrito 53 especies de *Leishmania*, incluidas en los subgéneros y complejos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complejo *L. enriettii* y *Paraleishmania*.^{13,14}

Se estima que más de 12 millones de personas en el mundo están infectadas, mientras que 350 millones se encuentran en riesgo de infección. La incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 1.3 millones de casos nuevos cada año. Se ha reportado que es endémica en 98 países que van de la cuenca mediterránea, Oriente Medio, el subcontinente de India, y las regiones tropicales y subtropicales de América y África. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, es una enfermedad tropical desatendida por estar asociada a la pobreza, ya que preferentemente se encuentra limitada a zonas rurales; sin embargo, también está distribuida en las zonas urbanas de los países.^{13,15}

Los reservorios principales de *Leishmania* son mamíferos silvestres y domésticos, como roedores y cánidos, siendo el hombre un hospedero accidental. En éstos, el parásito es inoculado en la piel a través de la picadura de un insecto hematófago infectado, el cual pertenece al orden Diptera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae. Actualmente, se han reportado cerca de 800 especies agrupadas en 6 géneros, de los cuales *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius*, están distribuidos en el Viejo Mundo, mientras que en el Nuevo mundo se encuentran los géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*.^{14,16}

3.2 Manifestaciones clínicas

Las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis dependen de factores, tales como la especie del parásito, la respuesta inmune y genética del hospedero, así como la presencia de otras infecciones.^{17,18}

Aunque el 90% de las manifestaciones están asociadas a la piel generalmente, pueden clasificarse en tres cuadros clínicos: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis visceral (LV).¹

La LC puede ser: localizada (LCL) y diseminada (LCD), en América por lo general, son provocadas por las especies *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*, respectivamente. La LCL es la forma con mayor distribución y frecuencia a nivel mundial, se caracteriza por la formación de una úlcera con cicatrices permanentes en la piel, las cuales se encuentran con frecuencia en zonas expuestas del cuerpo como cara, cuello, brazos y piernas. Para esta forma de la enfermedad, la úlcera está limitada a la zona de la picadura, debido a una respuesta inmune celular protectora. Por su parte, la LCD se caracteriza por una pobre respuesta celular, lo que permite la diseminación no controlada en la piel, manifestando lesiones nodulares con gran número de parásitos.^{1,19}

Una variante de la LC es la mucocutánea difusa o mucosa, que puede presentarse meses o años después de la úlcera inicial, implica la desfiguración progresiva de la unión entre las mucosas nasal y oral, lo que provoca una severa desfiguración facial, dificultades para respirar y deglutir, así como afonía y asfixia. En el continente americano está frecuentemente asociada a las especies *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*.^{1,19}

La forma más severa corresponde a la LV o sistémica, la cual afecta a órganos viscerales como hígado y bazo, provocando complicaciones mortales. También, se caracteriza por fiebres prolongadas, pérdida de peso, anemia y pancitopenia. Tiene un periodo de incubación de 2 a 8 meses después de la picadura. El agente causal más común en América es *L. (L.) chagasi*.^{1,19}

3.3 Leishmaniasis en México

En México es considerada una enfermedad rezagada y que afecta a los sectores más vulnerables de la población. Actualmente, la población en riesgo se distribuye a 13 estados con aproximadamente 9 millones de habitantes, principalmente, se presenta en los estados del sureste y se han identificado focos

de transmisión en Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Nayarit. De acuerdo a los reportes de la Secretaría de Salud de México de los años 1995-2009, se presentan aproximadamente 900 casos al año; sin embargo, el número real es incierto debido a la falta de estudios epidemiológicos suficientes.^{2,20}

En el país se han reportado casos de las tres manifestaciones clínicas, siendo la más común la LC. Particularmente, la LCL es endémica en el sureste y es conocida comúnmente como la “úlceras del chiclero”, ya que se presentaba generalmente en habitantes que se dedicaban al cultivo de chicle. También, esta forma de la enfermedad, se presenta con frecuencia en áreas agrícolas donde se siembra y cosecha cacao o café, cuyos desechos orgánicos favorecen el desarrollo de los flebótomos.²

Las tres especies que se han identificado en México son *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) mexicana*, siendo ésta última la más frecuente y corresponde al agente causal de la LCL en la península de Yucatán, en esta región el vector responsable de su transmisión es la especie *Lutzomyia olmeca*.^{2,21,22}

3.4 Ciclo biológico del parásito

Leishmania tiene un ciclo de vida dimórfico, puesto que incluye las formas evolutivas: promastigote y amastigote. Cuando el flebótomo se alimenta de la sangre infectada de un reservorio mamífero u hospedero, ingiere macrófagos con amastigotes, esta forma del parásito se caracteriza por ser intracelular, ovoide y sin motilidad. En el interior del insecto, los amastigotes se diferencian en promastigotes, los cuales son extracelulares, elongados, flagelados y se desarrollan en el intestino medio, lugar donde pasan por diferentes estados fisiológicos hasta culminar en promastigotes metacíclicos, que corresponden a la forma infectante en los mamíferos. Los promastigotes metacíclicos, migran del intestino medio a la parte anterior del sistema digestivo del vector conocido como probóscide, donde permanecen hasta ser inoculados en un nuevo hospedero. Con la picadura, el flebótomo inocular en la piel entre 600 a 100 mil promastigotes

metacíclicos. En el hospedero algunos promastigotes son destruidos, mientras que otros son fagocitados por células del sistema reticuloendotelial como macrófagos y células dendríticas, así como por células de Langerhans. Continuando con el ciclo, dentro del fagolisosoma de los macrófagos, los promastigotes pierden el flagelo y se diferencian en amastigotes, posteriormente se reproducen por fisión binaria, a partir de lo cual pueden obtenerse desde decenas hasta cientos de amastigotes, provocando la lisis de la célula hospedadora y diseminándose en el líquido intersticial. De esta manera, pueden infectarse macrófagos y células fagocíticas de otros órganos, como ocurre en la LV en la cual se afectan células de bazo, hígado y médula ósea.^{1,23,24}

3.5 Respuesta inmune a *Leishmania*

Una respuesta inmune protectora a *Leishmania* está mediada tanto por la respuesta innata como la adaptativa.

Respuesta innata inducida por *Leishmania*:

Inicialmente, los parásitos son reconocidos a través de sus moléculas de superficie por receptores presentes en macrófagos, células dendríticas y células NK (como el lipofosfoglicano reconocido por los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) de tipo 2), lo que induce la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-12) y moléculas coestimuladoras (CD40, B7-1 y B7-2).^{25,26}

Los macrófagos aunque son el principal blanco para la replicación del parásito, también pueden actuar como células efectoras, de tal forma que el resultado de la infección depende principalmente de cómo estas células se activen. El metabolismo del aminoácido L-arginina es crucial en la activación, al ser un sustrato común para las enzimas que se encuentran en el ambiente de la respuesta inmune. Por lo tanto, cuando los macrófagos están expuestos a las citocinas TNF- α e IFN- γ , se presenta una activación clásica o leishmanicida, en donde la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*) conduce al metabolismo de L-arginina hacia la

producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (EROs, como aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno), mecanismos que promueven la muerte del parásito. Por lo contrario, en presencia de IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β se presenta la activación alternativa de macrófagos, en donde se induce el metabolismo de la L-arginina hacia la síntesis de L-ornitina, el cual es sustrato para la ornitina descarboxilasa y se metaboliza en putrescina, una poliamina importante para la proliferación del parásito.²⁷⁻³¹

Otras células que se recluyen de forma temprana en el sitio de infección son los neutrófilos, éstos pueden eliminar al parásito o protegerlo, lo cual va depender de la especie de *Leishmania*. Los neutrófilos eliminan al parásito a través de su mecanismo microbicida conocido como netosis, en el cual liberan redes extracelulares que permiten atrapar a los parásitos para destruirlos. Además, cuando presentan necrosis, se induce una acción leishmanicida mediada por TNF- α y la elastasa neutrofílica, reduciendo el número de parásitos fagocitados por los macrófagos. Sin embargo, cuando sufren de apoptosis y son fagocitados por macrófagos, suprimen la activación de estas células y promueven el progreso de la enfermedad.³²⁻³⁶

Igualmente se recluyen en el sitio de infección monocitos y células dendríticas. Se ha sugerido que los monocitos tienen una función protectora, ya que después de la infección, se dirigen hacia la lesión y liberan EROs que pueden controlar al parásito de forma temprana.³⁷

Los monocitos también pueden diferenciarse en células dendríticas, las cuales son CPAs altamente especializadas y tienen un papel importante en el inicio de la inmunidad mediada por células T. Las células dendríticas fagocitan a los amastigotes y al activarse estimulan la producción de IL-12 (citocina que induce la expresión de iNOS, óxido nítrico e IFN- γ), la expresión de moléculas coestimuladoras (como CD80, CD86 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*)), además,

migran hacia los nódulos linfáticos de drenaje donde tiene lugar la presentación de antígenos a los LT.³⁸⁻⁴⁰

Cabe mencionar que después de la infección por *Leishmania*, la producción de IFN- γ por las células NK y las células T CD8⁺ en los nódulos linfáticos de drenaje, promueve un incremento en la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas, la cual también es una citocina significativa en la diferenciación de células T_{H1} y la supresión de células T_{H2}.^{39,41,42}

Respuesta inmune adaptativa inducida por *Leishmania*:

La respuesta inmune celular en la LC se ha estudiado principalmente en modelos murinos infectados con *L. (L.) major*, pues ha permitido exponer el paradigma T_{H1}-T_{H2}, relacionado con una respuesta inmune protectora o el progreso de la enfermedad.⁴³

Para la presentación antigénica a los LT CD4⁺ naïve (T_{H0}), las CPAs tienen que procesar a los antígenos exógenos a través de proteínas endosómicas y lisosómicas para la obtención de péptidos, éstos se unen a las moléculas de la clase II del MHC, dicho complejo se expresa en la superficie celular para que pueda ser reconocido por las células T_{H0}.⁴⁴

Dependiendo del microambiente de citocinas, se puede orientar la respuesta inmune a un tipo T_{H1} o T_{H2}. En presencia de IL-4 se activan los linfocitos T_{H2} que inducen la producción de IL-5, lo que conduce a la activación y diferenciación de las células plasmáticas productoras de anticuerpos, principalmente, el isotipo IgG y sus subtipos. El desarrollo de una respuesta humoral mediada por anticuerpos está relacionada con el progreso de la leishmaniasis, puesto que la unión de anticuerpos IgG a los receptores de los macrófagos (Fc γ R), induce la producción de IL-10 e inhibe la producción de IL-12. Las células T_{H2}, también inducen la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-4 e IL-13, lo que promueve el desarrollo de la lesión.^{22,45-47}

Por su parte, la presencia de IL-12 en el medio, activa a los linfocitos CD4⁺ T_H1 que inducen la producción de IFN- γ , citocina que activa a los linfocitos T CD8⁺, los cuales son capaces de eliminar células infectadas mediante sus mecanismos de citotoxicidad (exocitosis de gránulos líticos y expresión de los ligandos FasL/CD95L). De forma paralela, con la producción de IFN- γ se activa la vía de producción de óxido nítrico de los macrófagos. También, se induce la producción de otras citocinas importantes en la activación de mecanismos leishmanicidas como TNF- α e IL-2. Además, las células T_H1 pueden migrar a la piel y eliminar a los parásitos; por lo tanto, una respuesta inmune tipo T_H1 está relacionada con la resistencia a la enfermedad, debido a que se ha observado que las lesiones son de menor tamaño y con un número reducido de parásitos.^{22,33,47,48}

Las células T_H1 y T_H2, igualmente participan en la diferenciación de las células B y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. En ratones, los anticuerpos IgG1 están relacionados con un perfil de respuesta tipo T_H2 general, debido a que la citocina IL-4 producida induce un cambio de isotipo de IgM a IgG1. Mientras que los anticuerpos IgG2a están relacionados con una respuesta tipo T_H1, en donde el cambio de isotipo es mediado por IFN- γ . En lo que respecta a una infección por *Leishmania*, se ha encontrado que la presencia de mayores niveles de IgG2a que del subtipo IgG1, está asociada a una respuesta inmune protectora a la enfermedad. Ante esto, los subtipos de IgG se han utilizado como indicadores de una respuesta T_H1 o T_H2, por lo que el cálculo de la razón IgG1/IgG2a es una herramienta que permite definir el fenotipo generado por las células T.⁴⁹⁻⁵²

Por otra parte, los LT CD8⁺ igualmente tienen un papel importante en la inmunidad adaptativa, éstas células reconocen antígenos intracelulares que son procesados vía proteosoma y están asociados a moléculas del MHC clase I. Es importante mencionar que también pueden reconocer antígenos exógenos, los cuales de alguna forma que no se ha elucidado, se asocian a las moléculas del MHC clase I y pueden ser presentados por algunas células dendríticas, este tipo de presentación antigénica es conocida como presentación cruzada.⁴⁴

La función de los LT CD8⁺ en la infección por *Leishmania* se ha asociado a la protección tanto en humanos como en ratones, ya que se han encontrado en la recuperación de pacientes infectados con *L. (L.) major* y *L. (L.) mexicana*. En un estudio se observó que la reducción de células T CD4⁺ en ratones BALB/c, promovió la resistencia a una infección por *L. (L.) major*, efecto relacionado a un entorno enriquecido de LT CD8⁺, además, se encontró que cuando los ratones fueron re infectados, dichas células tienen un papel importante en la producción de grandes cantidades de IFN- γ , lo que puede promover el cambio de una respuesta T_H2 a una de tipo T_H1.^{42,48,53-55}

No obstante, aunque las células T CD8⁺ tienen una participación importante en la protección, otros estudios muestran que tienen un papel patológico relacionado con el daño tisular provocado por sus mecanismos citotóxicos.^{33,56}

Por último, cabe mencionar que en humanos, no es posible observar una polarización T_H1/T_H2. Por lo cual, dado que la resistencia a la enfermedad está asociada a una respuesta T_H1 y que se ha visto una relación de dicha respuesta con la protección en la LC, algunos autores mencionan que una vacuna ideal para la leishmaniasis debe de inducir una respuesta tipo T_H1 específica, fuerte y duradera para prevenir la enfermedad. Sin embargo, en otros estudios se sugiere que para la protección a la enfermedad, es necesaria la inducción de una respuesta tanto T_H1 como T_H2.^{40,56,57}

3.6 Tratamientos para la leishmaniasis

Como tratamientos sistémicos y considerados de primera elección se encuentran los antimoniales pentavalentes, como Pentostam[®] (estiboglutanato sódico) y Glutantime[®] (N-metilglutamina). No obstante, su uso no ha sido aprobado por la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drugs Administration*) a causa de los efectos adversos que ocasionan, como dolor en las articulaciones, náuseas, dolor abdominal, pancreatitis, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad.^{1,58}

Entre los medicamentos de segunda elección están los antiparasitarios y los antifúngicos, como la Anfotericina B y Miltefosina que de igual manera provocan fuertes efectos tóxicos e incluso la muerte. También, se han propuesto otros medicamentos alternativos, como por ejemplo, el tratamiento solo o combinado de Ketoconazol, Itraconazol, Flucanazol y Allopurinol; sin embargo, han resultado poco efectivos.^{1,59}

Aunado a la eficacia limitada y los efectos secundarios que provocan los tratamientos, se encuentran sus regímenes largos de terapia y alto costo; además, es importante mencionar que una de las principales causas del fracaso de los medicamentos es la resistencia del parásito a éstos, por lo que han surgido otras alternativas de tratamiento como la irradiación, cauterización, crioterapia y terapia fotodinámica para la LC, no obstante, no son capaces de eliminar al parásito, ni controlar la enfermedad.⁵⁹⁻⁶¹

El problema en el control de la leishmaniasis no sólo es por la ausencia de tratamientos 100% eficaces y no tóxicos, sino también por el control difícil del vector y los reservorios tanto silvestres como domésticos. Es por lo anterior, que el uso de vacunas resulta una estrategia viable y prometedora, debido a que los parásitos no generan resistencia a éstas, es posible la inducción de un efecto duradero, la enfermedad podría prevenirse y la transmisión reducir.^{1,57}

3.7 Vacunas contra la leishmaniasis

La posibilidad de una vacuna contra la leishmaniasis, surge de lo observado en personas que se han recuperado de la enfermedad y son resistentes a una reinfección. En términos generales, una vacuna ideal para esta enfermedad debe ser: a) segura; b) tener antígenos con identidad elevada entre múltiples especies; c) inducir una inmunidad duradera y protectora; d) tener un proceso de obtención a gran escala y reproducible.^{57,62,63}

Hasta la fecha, se han evaluado diversos antígenos y formulaciones de vacunas; sin embargo, a pesar del éxito obtenido en modelos murinos, se ha observado que la efectividad de un gran número de candidatos a vacuna se reduce en

modelos animales desarrollados y generalmente fracasan cuando son evaluados en humanos. En consecuencia, el desarrollo de vacunas para esta patología ha sido lento y limitado.⁶⁴

Los candidatos a vacunas para la leishmaniasis se han dividido en cuatro categorías dependiendo del tipo de vacuna: a) Leishmanización o inoculación de parásitos vivos, que incluyen construcciones genéticamente modificadas; b) Primera generación, consisten en fracciones o parásitos enteros muertos, con o sin adyuvantes; c) Segunda generación, incluyen vacunas de proteínas recombinantes; d) Tercera generación, corresponden a vacunas de ADN.^{65,66}

La Leishmanización y algunas de las vacunas de primera generación se han ensayado en humanos en diferentes partes del mundo, pero la estandarización de la mayoría de las formulaciones ha sido complicada, por lo que no pueden ser consideradas una opción viable para la obtención de una licencia, dadas las consideraciones regulatorias actuales.⁶⁷

Del mismo modo, el uso de vacunas atenuadas implica cierto riesgo, ya que existe la posibilidad de que el parásito se revierta a su condición virulenta, de modo que sólo algunas vacunas de este tipo son evaluadas en humanos; además, los resultados obtenidos han sido negativos o no concluyentes con respecto a la profilaxis, pero alentadores como formas terapéuticas.⁵⁹

Por su parte, las vacunas de tercera generación o de ADN, consisten en la clonación de genes de antígenos de *Leishmania* en plásmidos, para posteriormente ser inoculados en la piel o músculo del sujeto. Son vacunas que han demostrado inducir protección a una infección por *Leishmania* a través de una respuesta T_H1, esto puede deberse a que se acoplan de manera efectiva al MHC clase I y II, permitiendo de este modo la activación de células T CD8⁺ y T CD4⁺.⁶⁸⁻⁷⁰

A pesar de que las vacunas de ADN se consideran prometedoras por su respuesta inmune protectora, su evaluación se ha limitado a estudios preclínicos, dado que su uso no ha sido aprobado en humanos por el temor a la integración

del ADN plasmídico al genoma del hospedero y que como consecuencia provoque efectos adversos tales como mutaciones, tolerancia o procesos autoinmunes. No obstante, diversos ensayos se encuentran en desarrollo con el fin de obtener información sobre su seguridad y eficacia. Por lo tanto, se ha optado por dirigir esfuerzos en la búsqueda de vacunas basados en proteínas recombinantes, ya que con la tecnología de ADN recombinante existe la posibilidad de desarrollar de forma más sencilla una amplia variedad de vacunas más seguras y estables.⁷¹⁻⁷⁴

En la producción de vacunas recombinantes, se emplean genes de agentes patógenos que codifican para los antígenos que inducen la respuesta inmune. Para esto, el gen de interés es insertado en un plásmido, con el que se transforman microorganismos (virus, bacterias, hongos o levaduras) o transfectan líneas celulares. Posteriormente, los microorganismos o células son cultivados con el fin de producir la proteína deseada, por último ésta es aislada y purificada para su uso como vacuna. Dichas vacunas, aunque son más seguras en comparación con las de primera y tercera generación, inducen una inmunidad de tipo humoral o una respuesta tipo T_H2 y son moderadamente inmunogénicas. Pese a esto, es posible incrementar su eficacia e inducir una respuesta inmune celular o T_H1, mediante el uso de adyuvantes. Hasta ahora, se han evaluado distintos antígenos recombinantes con resultados prometedores, incluso algunos han sido probados en las primeras etapas de estudios clínicos.^{66,75-77}

Por otro lado, en la actualidad se están examinando otras estrategias para el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis, por ejemplo, la búsqueda de sustancias presentes en la saliva de los flebótomos que pudieran ser usadas como vacuna. Incluso se está evaluando la combinación de antígenos de las glándulas salivales de flebótomos y antígenos recombinantes.^{77,78}

Así también, se han evaluado péptidos sintéticos como vacuna. En un estudio se obtuvieron del genoma de *L. (L.) major* y demostraron ser inmunogénicos en

modelos murinos y caninos, aunque es necesaria la evaluación de su efecto protector, para ser considerados nuevos candidatos a vacuna.^{79,80}

3.7.1 Adyuvantes

Los adyuvantes son moléculas, compuestos o complejos macromoleculares que coadministrados con un antígeno incrementan la magnitud, calidad y duración de la respuesta inmune específica al antígeno.⁸¹

La formulación de vacunas con adyuvantes se ha vuelto fundamental, ya que éstos permiten reducir la cantidad de antígeno y el número de refuerzos necesarios para conseguir una respuesta inmune óptima. En la actualidad, se están dedicando esfuerzos a la obtención de adyuvantes eficaces y seguros para su uso en humanos, porque a pesar de que algunos han demostrado tener una eficacia al incrementar la respuesta inmune, la mayoría de éstos son tóxicos. Actualmente, el monofosforil lípido A (MLA) y glucopiranosil lípido A (GLA) son aprobados en estudios clínicos y son considerados como adyuvantes prometedores para vacunas.⁸²⁻⁸⁵

El MLA, GLA, las sales de aluminio, el Imiquimod y secuencias no metiladas de citosina fosfato guanosa (CpG), se han empleado como adyuvantes en vacunas contra la LC. A diferencia de las sales de aluminio, los otros son agonistas de TLRs. Los TLRs son receptores que se encuentran en la superficie celular y en las membranas intracelulares, los cuales han sido propuestos como una estrategia fundamental en el desarrollo de vacunas, debido a que se encuentran principalmente en monocitos, macrófagos y células dendríticas. Estos receptores, reconocen estructuras microbianas conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), activan la transducción de señales y factores de transcripción que inducen la expresión de genes, cuyos productos son importantes para la inducción de las respuestas celulares antimicrobianas y proinflamatorias. De tal manera que los adyuvantes agonistas de TLRs imitan a

los PAMPs y su actividad es mediada por la activación de estos receptores en las células.^{44,86,87}

Monofosforil lípido A:

Es un adyuvante agonista del TLR4, obtenido de la pared celular de *Salmonella minnesota* a partir de un proceso de hidrolisis, en el cual el lípido A del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, se transforma en una mezcla de glucosaminas aciladas, este proceso reduce la toxicidad manteniendo el efecto inmunogénico del lípido A. La estructura del MLA generalmente, consta de seis cadenas laterales aciladas, un grupo fosforilo y no tiene cadenas laterales de polisacáridos.⁸⁸

Este adyuvante emula la acción del LPS activando a los TLR4 de las CPAs, su mecanismo de acción es a través de la activación de las vías de señalización de las proteínas MyD88 y TRIF que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, interferones tipo 1 y quimiocinas. Se ha encontrado que preferentemente promueve la diferenciación de células T CD4⁺ T_H1 y mejora la respuesta inmune hacia antígenos coadministrados. Por lo que ha sido ampliamente usado en la evaluación de vacunas profilácticas contra la leishmaniasis, demostrando ser efectiva contra la LC y LV en modelos murinos.^{82,86,89}

EL MLA al ser un derivado natural, el control de su manufactura y la reproducibilidad del proceso puede ser un reto; por lo tanto, actualmente se tiene un enfoque en el desarrollo de sustancias sintéticas y puras, como el GLA.⁸⁵

Glucopiranosil lípido A:

Es un adyuvante derivado del lípido A, es una variante del MLA, tiene una molécula hexaacilida óptima para la participación de los TLR4, estimula la respuesta inmune innata y adaptativa, promoviendo la maduración de las células dendríticas y la liberación citocinas inflamatorias y quimiocinas asociadas con el tráfico celular (CCL4, CCL5, CCL7, y CXCL10). Asimismo, es más activa en las

CPAs de ratones y humanos que el MLA e induce preferentemente una respuesta T_H1 . Tanto MLA como GLA pueden estimular la producción de elevados niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12.^{7,89-91}

El GLA se ha formulado en emulsión agua en aceite (GLA-SE), demostrando que en comparación con el GLA solo, su actividad incrementa al inducir una mayor respuesta inmune innata, expresión de citocinas, activación de leucocitos, reclutamiento y activación de las células dendríticas en los ganglios linfáticos, además, no produce efectos secundarios en ratones y primates. Así también, se ha encontrado que un candidato a vacuna para la leishmaniasis compuesto por la proteína LmSTI1 más GLA-SE y administrado vía s.c en ratones BALB/c, fue capaz de inducir una mayor respuesta T_H1 , proporción IgG2a:IgG1 y número de células productoras de IFN- γ , en comparación con la vacuna compuesta por GLA en formulación liposomal o solución acuosa.^{86,92-94}

GLA-SE, MLA-SE y las sales de aluminio, son adyuvantes que el Instituto de Investigación en Enfermedades Infecciosas (IDRI, del inglés *Infectious Disease Research Institute*) emplea para el diseño de sus candidatos a vacunas contra *L. (L.) major* y *L. (L.) donovani*. Existen reportes que indican que la formulación con GLA-SE, es más potente que la de MLA-SE, en términos de estimular la activación de CPAs e inducir una producción mayor de IFN- γ , también se observó que a dosis bajas GLA-SE induce una frecuencia alta de células T efectoras.^{62,86,95,96}

E6020:

Es un adyuvante sintético nuevo, derivado de lípido A que mantiene gran parte de la actividad inmunoestimulante del LPS. Está químicamente definido, consiste en una cadena principal simple hexaacilada no cíclica, es un dímero fosfolipídico y a diferencia del MLA y GLA carece de una molécula de azúcar que orienta residuos lipídicos. Su estructura simplificada, permite una síntesis más rápida y una producción mejor, lo que resulta en avances prometedores en términos de costos y seguridad sobre las preparaciones de lípido A naturales. Dicha

simplificación no afecta de manera adversa su actividad biológica, pues se ha reportado que su uso en vacunas recombinantes puede inducir una producción de citocinas a un nivel similar a las que emplean LPS como adyuvante. Su modo de acción es activado la señalización NF- κ B y en ratones estimula la liberación de citocinas únicamente a través de los TLR4.^{97,98}

Al evaluarse junto con diferentes antígenos, es capaz de inducir una respuesta inmune protectora, característica por la inducción de una respuesta T_H1. Además, es un adyuvante que ha sido diseñado para ser compatible con diferentes formulaciones y sistemas. Por ejemplo, en formulación con la emulsión agua-aceite MF59, también fue capaz de orientar la respuesta inmune hacia T_H1.⁹⁷⁻¹⁰⁰

De acuerdo a la respuesta que induce, E6020 ha sido propuesto para el diseño de vacunas recombinantes contra parásitos intracelulares como *Trypanosoma cruzi*. Recientemente, se encontró que la administración de E6020 en emulsión estable con escualeno (E6020-SE) y la proteína recombinante Tc24, promovió una reducción de la parasitemia y un incremento en la sobrevivencia de ratones con una infección aguda por *Trypanosoma cruzi*. La respuesta inmune inducida por esta vacuna terapéutica, se relacionó con una respuesta tipo T_H1 por la producción de IgG2a e IFN- γ . Además, curiosamente se observó que sólo el adyuvante provocó un incremento en la sobrevivencia, esto sugiere que E6020-SE pudo actuar como refuerzo de la respuesta inmune propia de los antígenos nativos de *T. cruzi* durante la infección. E6020 no ha sido evaluado en vacunas contra *Leishmania*, pero con base a lo anterior, su uso puede ser considerado.^{101,102}

Por otro lado, este adyuvante ha demostrado ser compatible con diferentes vías de administración, ya que cuando se aplicó de forma s.c o intranasal fue capaz de mejorar la respuesta de antígenos proteicos, por lo cual, resulta factible su uso en vacunas administradas a través de rutas diferentes a las convencionales.⁹⁷

Actualmente, E6020 sólo se ha evaluado en estudios preclínicos, encontrándose que tiene un perfil de seguridad prometedor basado en investigaciones con

diferentes modelos animales, por lo que se ha sugerido la posibilidad de su uso en humanos.^{97,98,100}

3.7.2 Vacunas recombinantes contra la leishmaniasis

Los avances en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis han propuesto la posibilidad de una vacuna contra esta enfermedad dentro de pocos años. Hasta la fecha se han evaluado y sugerido varios antígenos recombinantes como candidatos a vacuna para las distintas formas de la leishmaniasis.¹⁰³

El primer antígeno recombinante usado como vacuna para la leishmaniasis fue GP63 o leishmaniolisina, la cual es una abundante glicoproteína de membrana presente en promastigotes de todas las especies de *Leishmania*. Su eficacia en inducir protección ha sido evaluada en varios modelos experimentales utilizando diferentes cepas y adyuvantes, obteniéndose resultados contradictorios, ya que éstos son prometedores en estudios preclínicos, pero no en humanos, porque induce una respuesta pobre de células T. Por consiguiente, se decidió emplear otras estrategias, como por ejemplo, la evaluación de GP63r encapsulado en un liposoma catiónico en formulación con MLA, esta vacuna al administrarse por vía s.c en ratones BALB/c, favoreció la inducción de una respuesta T_H1 (producción de IFN- γ , IL-2 y óxido nítrico) antes y después del reto con *L. (L.) donovani* (LT productores de IFN- γ y elevada proporción IgG2a/IgG1).^{57,68,104–106}

Otra proteína de superficie específica de promastigotes, es GP46/M2 o PSA-2, se expresa en todas las especies excepto en *L. (V.) braziliensis*. Se encontró que la administración vía intraperitoneal (i.p) de la proteína pura más *Corynebacterium parvum* como adyuvante, confiere protección a una infección por *L. (L.) major*. Asimismo, como proteína nativa demostró inducir una respuesta inmune protectora a *L. (L.) amazonensis*. Sin embargo, como proteína recombinante induce una protección variable, ya que es capaz de inducir un efecto protector a una infección por *L. (L.) amazonensis*, pero no a una infección por *L. (L.) major*. Esto sugiere que la proteína nativa puede ser importante para el procesamiento y presentación antigénica por las CPAs.^{107–109}

LACK (homólogo del receptor para la quinasa C activada de *Leishmania*) es también considerado como un antígeno prometedor, se encuentra expresado en los dos estadios del parásito y está conservado en varias especies de *Leishmania*. No obstante, a pesar de que una porción de esta proteína (p24) más IL-12 administrada de forma s.c, fue capaz de conferir protección a una infección por *L. (L.) major* en ratones BALB/c, se ha señalado que LACK no induce un efecto protector para la LV.¹¹⁰⁻¹¹²

Las proteínas específicas de amastigotes como A2, P4 y P8 de *L. (L.) pifanoi*, son considerados también como candidatos a vacunas. En un estudio, P4 y P8 junto con *Corynebacterium parvum* como adyuvante fueron administrados vía i.p en ratones BALB/c, demostrando promover un efecto protector parcial a completo, al reducir el tamaño de lesión y la carga parasitaria en ratones infectados con *L. (L.) pifanoi*. Al evaluar sólo la proteína P8, se encontró que indujo una protección parcial en ratones BALB/c y completa en ratones CBA/J que fueron infectados con *L. (L.) amazonensis*, así como un aumento en la producción de IFN- γ . Por su parte, A2 formulada con *Propianibactrium acne* como adyuvante y administrada vía i.p, demostró reducir significativamente la carga parasitaria en el bazo de ratones infectados con *L. (L.) donovani*, además, promovió un aumento en la producción de IFN- γ y en los niveles de IgG1 e IgG2a, sugiriéndose una respuesta T_H1/T_H2 mixta.^{113,114}

El Ligando de fucosa-manosa (FML), es una fracción glicoproteica localizada en la superficie del parásito durante todo su ciclo de vida y fue aislado por primera vez en *L. (L.) donovani*. En la actualidad, está comercialmente disponible en Brasil bajo el nombre de Leishmune® para el tratamiento de la LV en perros y se aplica vía s.c. Esta vacuna ha demostrado promover la activación de LT CD8⁺ y niveles altos de IFN- γ , óxido nítrico y anticuerpos IgG2.^{115,116}

Existen otras proteínas recombinantes que han sido sugeridas como candidatos a vacuna contra *Leishmania*, sin embargo, no todas han demostrado ser eficaces y ha sido posible su evaluación en las primeras fases de ensayos clínicos. LEISH-

F1 o Leish-111f, fue el primer candidato a vacuna que se evaluó en fase clínica y ya se ha probado hasta fase 2, consiste en la fusión de la proteína antioxidante específica de tiol de *L. (L.) major* (TSA), la proteína inducible por estrés de *L. (L.) major* (LmSTI1) y el factor de iniciación de elongación de *L. (L.) major* (LeIF). Este antígeno administrado vía s.c junto con el adyuvante MLA-SE ha demostrado ser inmunogénico, al promover una producción elevada de IFN- γ por las células T. Además, demostró ser seguro en sujetos sanos, con y sin antecedentes de una infección con *L. (L.) donovani*. Así también, es considerado como un adyuvante terapéutico en lo antimoniales pentavalentes para la LC y LM humana, demostrando que con su uso es posible reducir el tiempo del tratamiento. No obstante, no tuvo éxito contra infecciones con *L. (L.) infantum*.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Con base al éxito preliminar de LEISH-F1, se realizó una nueva construcción llamada LEISH-F2, en la que no se incluye la histidina-tag en el extremo N-terminal y se reemplaza la lisina 274 por glutamina, esto con el fin optimizar el proceso de manufactura. A partir de ensayos en fase 1 y 2, se han obtenido resultados positivos relacionados a su inmunogenicidad y seguridad.^{96,120}

IDRI también está realizando ensayos en fase 1 con LEISH-F3 formulada con GLA-SE y administrada de forma i.m. Dichos ensayos se realizaron en voluntarios de Estados Unidos con el fin de evaluar la profilaxis de la vacuna, se encontró que ésta que es segura y capaz de inducir una respuesta antígeno-específica fuerte, con un balance de respuestas T_{H1}-T_{H2} y una producción significativa de IL-10. Es importante mencionar que LEISH-F3 es una proteína de fusión que incluye las proteínas la esterol 24c-metiltransferasas (SMT) de *L. (L.) infantum* y NH36, debido a que ambas han demostrado inducir protección contra diferentes especies de *Leishmania*.^{6,95,121,122}

3.7.2.1. Hidrolasa de nucleósidos de *Leishmania (L.) donovani* (NH36)

Las hidrolasas de nucleósidos son enzimas que como su nombre indica, catalizan la hidrólisis de nucleósidos mediante la ruptura del enlace N-glicosídico para la

producción de bases y ribosa en la síntesis de ADN. La mayoría de los parásitos protozoarios, como los del género de *Leishmania* no tienen la capacidad de síntesis *de novo* de bases nitrogenadas, por lo que es trascendental la actividad de dicha enzima en su replicación, para poder obtener purinas y/o pirimidinas de sus hospedadores. Es importante mencionar que la actividad de estas enzimas no se presenta en mamíferos.^{123,124}

NH36 es la hidrolasa de nucleósidos de *L. (L.) donovani*, tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa, corresponde al principal marcador antigénico del complejo fucosa-manosa (FML) y se encuentra presente en la superficie celular de amastigotes y promastigotes. Es una proteína considerada como un importante marcador filogenético del género *Leishmania*, ya que presenta un alto porcentaje de identidad en las especies que provocan las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis como *L. (L.) major* (95%), *L. (L.) mexicana* (93%), *L. (L.) chagasi* (99%), *L. (L.) infantum* (99%), *L. (L.) tropica* (97%), y *L. (V.) braziliensis* (84%). Este nivel de conservación es más elevado que GP63, TSA, CPb y las histonas H2B. Por lo anterior, NH36 puede ser considerado como un antígeno ideal para el diseño de vacunas, así como un prometedor candidato a vacuna bivalente y con protección cruzada contra la leishmaniasis.^{22,125–127}

Asimismo, es un antígeno presente en estados tempranos de la infección, lo que permite que sea un blanco excelente para el reconocimiento de patógenos por la respuesta inmune adaptativa, de tal forma que podría prevenir la replicación de patógenos en la primera etapa de su ciclo de vida y prevenir la infección.⁴

Se han realizado estudios destinados al diseño de vacunas con NH36, ensayados en diferentes modelos animales obteniéndose resultados prometedores. En su forma nativa y administrada junto con saponina vía s.c en ratones BALB/c, se encontró que concedió protección a una infección por *L. (L.) donovani*, se produjeron anticuerpos IgG específicos principalmente del subtipo IgG2a, disminuyó la carga parasitaria y el tamaño del hígado.¹²⁸

Como vacuna recombinante, NH36 administrada vía s.c con o sin IL-12 fue capaz de reducir la carga parasitaria y el tamaño de lesión en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) major*. Relacionado este efecto protector con una alta producción de IFN- γ y una disminución de IL-10. Empleando la misma vía de administración, formulando NH36r con saponina, la vacuna no indujo un efecto protector en ratones infectados con *L. (L.) mexicana*, ya que no se redujo el tamaño de la lesión. No obstante, cuando los animales fueron retados con *L. (L.) chagasi*, se produjeron más anticuerpos IgG2a que IgG1 y la vacuna promovió la reducción de la carga parasitaria en un 79%.^{3,6}

Leishmune[®] es la primera vacuna de segunda generación con uso aceptado para la LV canina, está compuesta por NH36, los adyuvantes QS21 y dos saponinas desacetiladas de *Quillaja saponina*. Su uso profiláctico en perros demostró promover un incremento en la producción de óxido nítrico (ON), IgG2 y anticuerpos contra FML y *L. (L.) chagasi*, así como un aumento en las proporciones IFN- γ /IL-4 de LT CD8⁺. Esta vacuna evidenció ser segura, inmunoproliférica e inmunoterapéutica en ratones y perros, además, fue capaz de inducir una protección cruzada en ratones con LC.¹²⁹

LEISH-F3 es una proteína recombinante desarrollada por IDRI. Tiene un peso molecular de 74 kDa que como se mencionó previamente, consiste en un polipéptido de fusión que incluye a NH36. Se ha formulado con los adyuvantes MLA-SE y GLA-SE. Por el momento no se cuenta con bibliografía referente a la respuesta protectora de la vacuna formulada con MLA-SE, pero se han realizado pruebas en fase clínica y se ha asegurado que posee una alta eficacia y seguridad.⁸³

Por su parte, existen reportes de LEISH-F3 con GLA-SE en estudios preclínicos y clínicos. Los resultados obtenidos en ratones BALB/c, indican que después de las inmunizaciones de la vacuna en la base de la cola, se obtuvieron títulos mayores de IgG2a sobre IgG1, una producción mayor de citocinas T_H1 (IFN- γ , TNF e IL-2) y niveles bajos de citocinas T_H2/T_{reg} (IL-5 e IL-10). Al evaluar su

efecto protector, en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. (L.) donovani* y *L. (L.) infantum*, se observó una reducción significativa de la carga parasitaria. También, se señaló la importancia de las células T CD4⁺ en la protección y en la reducción de la parasitemia. En cuanto a los ensayos clínicos, se obtuvo que el candidato a vacuna indujo una combinación de respuestas T_H1 y T_H2.⁹⁵

Por otro lado, con el fin de conocer el dominio responsable de NH36 en la inducción de una respuesta inmune protectora, se realizó un estudio en el cual la proteína completa se dividió en 3 fracciones. Debido a que la proteína está compuesta por 314 aminoácidos, F1 contenía los aminoácidos que van de 1-103 (dominio N-terminal), F2 agrupaba los aminoácidos 104-198 (dominio central) y F3 el grupo de 199-314 (dominio C-terminal). La proteína completa y sus fracciones fueron administradas vía s.c en ratones BALB/c, se determinó que la protección a una infección por *L. (L.) chagasi* era proporcionada por el dominio C-terminal, el cual indujo principalmente una respuesta de células T CD4⁺ y una menor contribución LT CD8⁺. Igualmente, se encontró que la protección inducida por los péptidos C-terminales fue mayor que la inducida por la proteína completa, pues se obtuvo un incremento de anticuerpos (IgM, IgG2a, IgG1, e IgG2b), producción de IFN- γ , proporción IFN- γ / IL-10 de LT CD4⁺ y LT CD8⁺, proporción TNF- α / IL-10 de LT CD4⁺, reacciones DTH, y una disminución de la carga parasitaria. Tanto en ratones como en perros infectados con *L. (L.) chagasi*, se observó que la vacuna NH36 induce una respuesta protectora mediada principalmente por células T CD4⁺, siendo esta respuesta dirigida por el dominio C-terminal.^{4,5}

En la búsqueda de una protección cruzada para la LC, los ratones fueron inmunizados vía s.c con las fracciones y posteriormente infectados con *L. (L.) amazonensis*, se encontró que aunque los dominios N y C inducen la reducción del tamaño de la lesión, sólo el dominio C-terminal promovió la disminución de la carga parasitaria. Lo anterior se volvió a evaluar formulando las fracciones con saponina, encontrándose resultados similares. A diferencia de la capacidad del

dominio C-terminal en inducir protección en la LV para el caso de la LC por *L. (L.) amazonensis*, la protección se indujo tanto por el dominio C-terminal como el N-terminal en proporciones similares. El dominio C-terminal, promovió una mayor respuesta DTH, proporción de células T CD4⁺ y T CD8⁺ antígeno-específicas, expresión de IFN- γ y TNF- α , y redujo un 75% del tamaño de la lesión. Mientras que la vacuna N-terminal indujo una respuesta DTH menor y una expresión leve de IFN- γ y TNF- α , y disminuyó un 65% el tamaño de la lesión.^{4,130}

Esta respuesta similar en la protección inducida por los dominios la región N-terminal y C-terminal, también se obtuvo al evaluar la vacuna en un esquema terapéutico. La región N-terminal y C-terminal disminuyeron el tamaño de las lesiones a un 48% y 64%, y la carga parasitaria a un 81% y 82.6%, respectivamente. Esto indica que ambas fracciones son importantes en el efecto protector inducido por NH36.⁵

3.8 Vías de administración de vacunas

La ruta de administración y la formulación de las vacunas son reconocidas como variables interrelacionadas que pueden influir en el perfil de las respuestas inmunes celulares y humorales resultantes. La vía a través de la cual es entregado el antígeno, no sólo tiene un efecto sobre la respuesta inmune obtenida, sino también en la magnitud de ésta, ya que determina los órganos y poblaciones celulares involucrados en la respuesta inmune. Esta influencia de las vías de administración en la inmunogenicidad de las vacunas se ha caracterizado en algunas formulaciones; por lo tanto, es importante considerar la determinación de una vía apropiada, dado que puede tener un efecto sobre la protección a una enfermedad.^{10,131,132}

Actualmente, las principales vías de administración parental son: i.m, s.c e i.d. Por vía i.m se aplican la mayoría de las vacunas inactivadas, por ejemplo, hepatitis A y B, rabia, virus del papiloma humano, influenza, neumococo y la combinación tétanos-difteria-tosferina-*Haemophilus Influenzae* tipo b. Por vía s.c se administran vacunas vivas-atenuadas como la de sarampión, paperas,

rubéola, varicela y fiebre amarilla. Mientras que por vía i.d se aplican vacunas como la de Bacillus Calmette-Guerin, rabia y viruela.¹³²

Otra vía parental es la intravenosa (i.v), en ésta el antígeno inoculado es llevado directamente al bazo para la presentación antigénica. No es una vía recomendable, porque el antígeno se elimina con más rapidez, lo que impide una estimulación prolongada de las células del sistema inmune. En algunos casos resulta útil como dosis de refuerzo.¹³³

Aunque las vías parentales s.c, i.m e i.d, primero transportan los antígenos a los nódulos linfáticos para la presentación antigénica, la piel y el músculo poseen distinta anatomía y propiedades inmunológicas.⁹

3.8.1 Vías de administración en la piel

La piel alberga CPAs como las células dendríticas de la dermis y las células de Langerhans, pero también involucra otros tipos de células como queratinocitos, células T, células endoteliales, mastocitos y basófilos. Tiene un papel tanto en la inmunidad innata como en la adaptiva y es considerada como un órgano atractivo para la administración de vacunas, porque alberga un gran número de CPAs especializadas, y por el fácil acceso a los nódulos linfáticos de drenaje, para la generación de células T efectoras y anticuerpos producidos por linfocitos B, por lo que es posible inducir una respuesta inmune protectora a largo plazo.^{134,135}

La piel es un órgano vascular de gran tamaño y se compone de tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis. La administración de vacunas en estas capas se conocen como vía transdérmica (t.d), i.d y s.c, respectivamente.¹³⁶

Vía transdérmica:

La administración de una vacuna vía t.d se realiza en la epidermis. Es la capa más externa y delgada, el 90% de la masa celular está conformada por los queratinocitos, mientras que las células dendríticas de Langerhans a pesar de que representan alrededor del 1% de la población celular, cubren casi el 20% del

área de superficie, debido a su orientación horizontal y protuberancias prolongadas.¹³⁷

Los queratinocitos son considerados como la primera línea de defensa en la epidermis, ya que después del reconocimiento de patógenos, liberan péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas para iniciar la respuesta inmune. Están en contacto cercano con las células de Langerhans y son considerados una fuente importante de mediadores que ayudan al desarrollo de éstas células, también pueden activar sus propiedades funcionales y promover su migración desde la epidermis. Debido a la que los queratinocitos son una fuente rica de citocinas inmunomoduladoras, se ha propuesto en el diseño de vacunas la posibilidad de manipular la secreción de ciertas citocinas, que permitan dirigir a las células dendríticas a inducir la respuesta de LT que se requiera.^{134,135,138}

Las células de Langerhans representan la segunda línea de defensa y se presentan tanto en ratones como en humanos. En humanos, se ha reportado que estas CPAs tienen una densidad de 1000 células/mm² en la epidermis, y es el único tipo de células dendríticas presente en esta capa de la piel. Los gránulos de Birmeck son orgánulos citoplasmáticos específicos de las células de Langerhans, cuya función y origen aún no se han esclarecido. También, estas células se caracterizan por expresar moléculas CD45, CD207 (langerina), MHC clase I y II, así como receptores Fc y de complemento. Durante su proceso de maduración, expresan moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) receptores de quimiocinas (CCR7) y moléculas de MHC I y II, ante esto, pueden presentar antígenos exógenos en el contexto del MHC clase II y realizar una presentación cruzada.^{134,139-144}

Por otro lado, la función de barrera física de la piel se debe al proceso queratinización, lo que representa el mayor obstáculo para la vacunación vía t.d. Ante esto, es necesario emplear un método adecuado de vacunación capaz interrumpir de manera física y química dicho estrato, para una entrega directa de los antígenos a las CPAs. Actualmente, sistemas de vacunación t.d no invasivos

se encuentran en desarrollo, a pesar de ello, todavía no se cuenta con la tecnología adecuada para permitir que las moléculas grandes puedan atravesar esta capa, además, no se ha demostrado sí estos sistemas pueden proporcionar una respuesta viable a los problemas de suministro y costos, que son particularmente importantes para el éxito de las campañas de vacunación.¹³⁶

Vía intradérmica:

La dermis es la segunda capa de la piel y es en donde se aplican las vacunas i.d. Es una capa resistente, flexible y más gruesa que la epidermis. La dermis reticular es una subcapa de la dermis compuesta de una red de fibras de colágeno, tejido conectivo y una red muy densa de capilares sanguíneos y vasos linfáticos, por donde circulan células dendríticas, monocitos, linfocitos polimorfonucleares y mastocitos. Los fibroblastos son las células más abundantes de la dermis, en este estrato también se encuentran células T de memoria y macrófagos, siendo éstos últimos más abundantes que las células dendríticas en ratones, mientras que en humanos se encuentran en igual proporción.^{136,145-147}

La presencia de las células dendríticas en esta capa de la piel, desempeñan un papel fundamental en la vacunación, al ser células altamente especializadas en la presentación antigénica. En la dermis, se encuentran dos grupos de células dendríticas: las células dendríticas dermales residentes y las células de Langerhans, éstas últimas se encuentran en este estrato debido a su migración hacia los nódulos linfáticos.^{134,136,148}

En la dermis de ratones, se encuentran dos tipos de células dendríticas residentes: Langerina⁺ (CD207 dDC) y Langerina⁻ (CD11b dDC). Ambas presentan antígenos exógenos vía MHC clase II, pero sólo las células Langerina⁺ han demostrado tener capacidad de realizar una presentación cruzada de antígenos. Esto se relaciona con lo observado después de una infección por *L. (L.) major*, ya que la presentación antigénica hacia los LT CD4⁺ fue mediada por las células Langerina⁻, mientras que las células Langerina⁺ interactuaron preferentemente con LT CD8⁺ durante la fase temprana de la infección.¹⁴⁹⁻¹⁵³

Además, se ha encontrado que células dendríticas Langerina⁻ no son muy eficientes en la presentación antigénica en comparación con las Langerina⁺ y las células de Langerhans; sin embargo, tienen un papel importante durante la inflamación, ya que son las más frecuentes en el sitio de inyección y están involucradas en la expansión de células T CD4⁺ efectoras y células T_{Reg}, asimismo, tienen la capacidad de regular la producción de citocinas producidas por estas células.¹⁵⁴

En cuanto a la respuesta humoral, las células de Langerhans y las Langerina⁺ actúan de forma diferente, ya que las primeras están relacionadas con la producción de anticuerpos IgG1, mientras que las células Langerina⁺ son requeridas para una producción de anticuerpos IgG2a.¹⁵⁵

Por otro lado, cabe mencionar que existen similitudes en el tejido linfoide asociado a la piel (SALT, del inglés *skin associated lymphoid tissue*) de ratones y humanos, incluyendo varios pero no todos los marcadores de superficie de las células dendríticas. Así como en los ratones, en la dermis de humanos se presentan dos tipos de células dendríticas residentes: CD1a⁺ y CD14⁺. Las CD1a⁺ son las que mayormente residen en la dermis, aunque su función específica todavía no está definida, se ha encontrado que inducen la proliferación de LT CD4⁺. Por su parte, las CD14⁺ se caracterizan por promover la producción de anticuerpos. A pesar de que las células dendríticas CD1a⁺ pueden activar mejor a los LT CD8⁺ que las CD14⁺, son menos eficientes que las Langerhans en la activación de estos linfocitos.^{141,156-158}

Por lo tanto, si el objetivo de una vacunación es lograr una presentación cruzada, una estrategia óptima sería la inmunización i.d. Esto se expuso comparando las vías de administración i.d e i.v, encontrando que la entrega de antígenos de manera localizada o i.d indujo una presentación antigénica cruzada lenta en comparación con la entrega sistemática, en donde dicho evento se desarrolló de forma rápida, sugiriendo que la persistencia del antígeno en la zona de inmunización por vía i.d, promueve que se induzca una respuesta inmune

expandida, robusta, polifuncional y efectora, ya que se encontraron más células T CD8⁺ efectoras con la capacidad de producir diez veces más citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) que después de la inmunización de forma i.v.¹⁵⁹

La aplicación de vacunas de forma i.d, ha demostrado promover tanto en ratones como humanos que las células de Langerhans sufran modificaciones en su morfología y se movilicen hacia la dermis; por lo tanto, son células que también influyen en la respuesta inmune inducida por la administración i.d. De manera que la vía i.d a diferencia de la vía t.d, no sólo tiene como blanco las células de Langerhans, sino también a las células dendríticas residentes de piel, que como se mencionó previamente, tienen un papel significativo en la respuesta inmune. Por mucho tiempo las células de Langerhans se consideraron como las principales CPAs de la piel; sin embargo, está claro que las células dendríticas de la dermis también son importantes, inclusive existen reportes que sugieren que éstas células son aún más importantes en la inmunidad que las células de Langerhans.^{135,160}

Por otra parte, las vacunas i.d han despertado un interés en el área de salud pública, porque se ha encontrado que requieren menos cantidad de antígeno que las vacunas administradas por las vías s.c e i.m para estimular una respuesta inmune adecuada. El uso de dosis menores al emplear vacunas i.d, permitiría disminuir costos e incrementar el suministro a la población, ya que reduciría el peso de la vacuna, así como la capacidad de almacenamiento, facilitando su distribución.^{161,162}

Vía subcutánea:

La última capa de la piel es la hipodermis o tejido subcutáneo, es una capa de tejido conectivo laxo y elastina. Está principalmente compuesta por fibroblastos y adipocitos, además, numerosos vasos linfáticos que drenan la dermis pasan a través de esta capa antes de llegar a ganglios linfáticos de drenaje.^{136,163,164}

Es en este estrato se aplican las vacunas s.c. Las capas de grasa no contienen las células necesarias y apropiadas para iniciar la respuesta inmune (fagocíticas

o CPAs), porque aunque alberga células dendríticas, los macrófagos son las células del sistema inmune más abundantes en dicho tejido. Los cuales no son células tan especializadas en la presentación antigénica como las células dendríticas, ya que no expresan constitutivamente moléculas coestimuladoras, por lo que requieren de un estímulo para una presentación adecuada del antígeno a los linfocitos T.^{10,165}

Es importante mencionar que las vacunas administradas por esta vía generalmente, inducen una respuesta humoral y no se recomienda que a través de esta ruta se administren vacunas con adyuvantes, ya que pueden provocar abscesos grasos y granulomas, debido a la retención del material inyectado. Así también, se ha reportado que vacunas con adyuvantes de sales de aluminio administradas de forma s.c tienen una inmunogenicidad menor que las administradas vía i.m, a pesar de que en el tejido hipodérmico se encuentre mayor cantidad de CPAs que en el músculo.^{166,167}

3.8.2 Vía intramuscular

La vía i.m es la principal ruta de inmunización establecida en los programas de vacunación del mundo. Las ventajas que posee incluyen: leve o ningún dolor en el lugar de la inyección, facilidad técnica y una mayor capacidad para el volumen inyectado. Además, se ha planteado que el músculo tiene la capacidad de protegerse de los efectos nocivos de sustancias inyectadas en él, debido a su abundante suministro de sangre, de tal manera que puede ser una de las razones del por qué la administración i.m es considerada una alternativa mejor para la aplicación de la mayoría de las vacunas con adyuvantes (hepatitis B y tétanos), en comparación con otras vías.^{11,12,168}

Con respecto a la inmunogenicidad de esta vía, se ha encontrado que células como macrófagos y células dendríticas están presentes antes y después de la administración i.m. Sin embargo, como se mencionó previamente el músculo contiene pocas CPAs profesionales. Es por ello, la necesidad de que el producto permanezca un tiempo prolongado en el lugar de inoculación, para garantizar que

se produzca una estimulación adecuada, se ha postulado que este “efecto de depósito” puede contribuir a la inmunogenicidad de las vacunas administradas por esta vía.^{169–172}

Por otra parte, se ha reportado que los mioblastos pueden actuar como CPAs-no profesionales y presentar antígenos vía MHC clase I y II, lo que podría ser una de las razones de la inmunogenicidad de las vacunas intramusculares, ya que dichas células se encuentran en elevada proporción en el músculo. Incluso, los mioblastos cuando se fusionan para formar miocitos, han demostrado tener una participación importante en la vacunación de ADN, puesto que contienen estructuras que facilitan la entrada del ADN, lo que podría explicar el por qué este tejido es mejor que otros en su internalización.^{173–175}

3.8.3 Efecto de las vías de administración en las vacunas

Diversos estudios se han realizado comparando la vía de administración de vacunas para enfermedades como rabia e influenza, sugiriendo que la ruta i.d es más inmunogénica que la i.m, en cuanto a la producción de anticuerpos específicos producidos en humanos.^{176–178}

Con el fin de tener una evidencia *in vivo* de la diferencia entre las vías de administración i.d e i.m en la inducción y calidad de la respuesta inmune, se realizó un estudio empleando la vacuna atenuada MVA (virus vaccinia Ankara modificado) en un modelo murino. En este trabajo, se encontró que el sitio donde se entrega el antígeno, influye en la participación de las CPAs en las primeras etapas de la presentación antigénica y en la activación de la respuesta celular. Se demostró que la vía i.d promueve una distribución rápida del antígeno y un mayor reclutamiento de CPAs como células dendríticas y macrófagos en los nódulos linfáticos de drenaje, en comparación con la administración i.m. Además, se observó que la ruta de administración tiene un efecto en la magnitud de la respuesta de LT antígeno-específicos y en la calidad de éstos, puesto que al aplicar la vacuna de forma i.d, la respuesta de LT CD4⁺ y CD8⁺ fue mayor y se generaron LT CD8⁺ multifuncionales, ya que éstos eran capaces de producir IFN-

y y TNF- α al mismo tiempo, mientras que con la administración i.m se encontraron LT CD8⁺ productores de una sola citocina.¹⁶⁸

En otro estudio, se compararon las mismas vías de administración con el fin de evaluar el efecto de la vacuna recombinante MVA85A en humanos, resultando que la vacuna fue capaz de generar una respuesta inmune celular intensa y duradera mediada principalmente por células T productoras de IFN- γ , pero esta respuesta es independiente de la vía de administración empleada. Aunque, se observó que los sujetos vacunados vía i.d exhibieron niveles altos de IgG en comparación con los sujetos inmunizados de forma i.m.¹⁷⁹

Por otro lado, el efecto protector de una vacuna también puede depender de la vía de administración. Esto se observó en la efectividad de la vacuna recombinante ID83 más gardiquimod administrada vía i.d, en proteger a ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* mediante una respuesta T_{H1}, efecto que no se observó cuando los ratones fueron inmunizados por vía s.c.⁷

En lo que respecta a las vacunas para la leishmaniasis, se han evaluado diversas rutas de administración tales como i.d, s.c, i.m e i.p, siendo la vía s.c la más común en modelos murinos y la i.m en humanos.⁵⁷

No obstante, no se ha evaluado a fondo el efecto de las vías de administración en la inmunogenicidad y efecto protector de una vacuna para la leishmaniasis. Un estudio reveló que la inmunización vía i.d de una vacuna de ADN contra *L. (L.) major* fue más eficiente que la vías s.c e i.m. Esto se obtuvo al evaluar la vacuna que codifica para los antígenos LACK, LmST11 y TSA en un modelo profiláctico en ratones C57Bl/6. Un experimento se hizo inmunizando con 50 μ g de la vacuna y se observó que los ratones fueron protegidos cuando la administración se realizó tanto por vía i.d como por vía s.c. Mientras que la vacuna administrada de forma i.m confirió una protección parcial. En otro experimento se evaluó una dosis de 10 μ g de vacuna y sólo la vía i.d demostró ser efectiva en comparación con las otras rutas, al promover una mayor frecuencia de LT CD8⁺ productores de IFN- γ .⁸

Como se mencionó, para el primer experimento tanto la vía i.d como la vía s.c indujeron protección, sin embargo, se ha reportado que la administración s.c de la vacuna recombinante NH36 más saponina, induce una respuesta humoral y no confiere protección a una infección por *L. (L.) mexicana*. De tal manera que la vía i.d podría ser considerada una ruta prometedora para la administración de vacunas para la leishmaniasis.^{6,8}

IV. OBJETIVO

General:

Evaluar y comparar la eficacia de la administración intramuscular e intradérmica de la proteína recombinante NH36 mediante la inducción de una respuesta inmune capaz de conferir protección a una infección por *L. (L.) mexicana*, en un esquema profiláctico en ratones BALB/c.

Específicos:

- Evaluar la respuesta inmune inducida por la inmunización intramuscular e intradérmica de la proteína recombinante NH36 en ratones BALB/c, mediante la cuantificación de los anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a, y la determinación de la población de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de las citocinas IFN- γ e IL-4.
- Evaluar el efecto protector conferido por la inmunización intramuscular e intradérmica de la proteína recombinante NH36 en ratones BALB/c, mediante la medición del tamaño de la lesión y la carga parasitaria del cojinete plantar.
- Comparar el efecto de la administración intramuscular e intradérmica del antígeno NH36 en la inducción de una respuesta inmune protectora a una infección por *L. (L.) mexicana*, en un esquema profiláctico en ratones BALB/c.

V. HIPÓTESIS

La administración intradérmica del candidato a vacuna profiláctica NH36r en ratones BALB/c induce una mejor respuesta inmune protectora tipo T_H1 contra *L. (L.) mexicana*, que la administración intramuscular.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Experimental, longitudinal y prospectivo.

6.2 Diseño experimental

El esquema de inmunización consta de 3 dosis administradas vía i.d o i.m, los refuerzos se aplicaron a los 14 y 28 días. Al día 42 un grupo de animales fue sacrificado para evaluar la respuesta inmune inducida por las vías de administración de NH36r, mientras que otro grupo fue infectado con *L. (L.) mexicana* para la evaluación de la protección.¹⁸⁰

El diagrama del diseño experimental y la metodología empleada en el presente estudio se muestran en la figura 1.

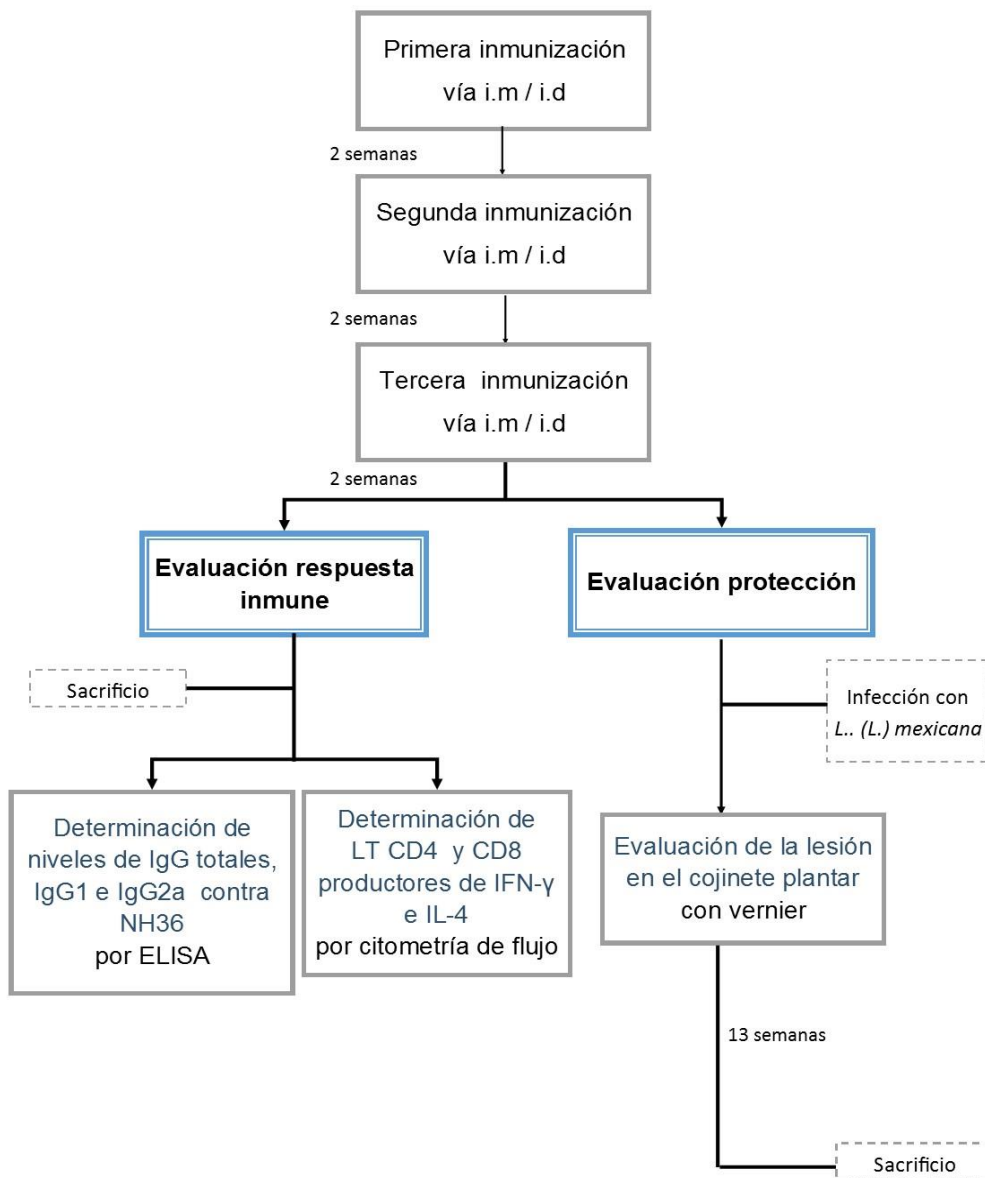


Figura 1. Diagrama del diseño experimental y metodología utilizada en el estudio.

6.3 Grupos experimentales

Los grupos experimentales y la formulación de los candidatos a vacuna que se evaluaron en este estudio, se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Formulación de la vacuna para los diferentes grupos experimentales

Grupos experimentales	NH36r	GLA-SE	E6020-SE	MLA	Solución salina	Vía de administración
<i>Control (solución salina) †*</i>	-----	-----	-----	-----	30 µL	i.d/i.m
<i>NH36r + GLA-SE †</i>	10 µg	5 µg	-----	-----	Cbp 30 µL	i.d/i.m
<i>NH36r + E6020-SE †*</i>	10 µg	-----	5 µg	-----	Cbp 30 µL	i.d/i.m
<i>NH36r + MLA *</i>	10 µg	-----	-----	10 µg	Cbp 30 µL	i.d/i.m

† Grupos para la evaluación de inmunogenicidad (n=7)

* Grupos para la evaluación de protección (n=7, grupos control n=5)

i. d: vía intradérmica

i.m: vía intramuscular

La dosis de proteína se estableció de acuerdo a lo propuesto por McAtee y colaboradores, quienes sugieren un aumento en la dosis de NH36r para ser evaluada como vacuna contra *L (L.) mexicana*, por lo que se decidió utilizar 10 µg de dicha proteína.¹⁸⁰

La vacuna se formuló con adyuvantes agonistas de TLR-4 derivados de lípido A, los cuales han demostrado inducir una respuesta inmune T_H1. Se evaluaron distintos adyuvantes, para observar si el efecto de las vías de administración es independiente del adyuvante utilizado.

Para la evaluación de la respuesta inmune inducida por las vías de administración, la proteína NH36 se formuló con los adyuvantes GLA-SE (IDRI) y E6020-SE (Eisai Co. Ltd, emulsificado en AddaVaxTM (InvivoGen)). Las dosis empleadas fueron establecidas de acuerdo a lo propuesto por el Instituto Sabin de Vacunas y con base a lo reportado en estudios de vacunas recombinantes, en los cuales se propone una formulación con 5 µg de GLA-SE y E6020-SE, la cual es capaz de inducir una respuesta T_H1.^{83,102,181–183}

Por su parte, para la evaluación de la protección conferida por las distintas vías de administración, se sustituyó el adyuvante GLA-SE por el MLA comercial (Sigma Aldrich, No. de catálogo L 6895-5MG) dadas sus similitudes en cuanto a función y estructura. Esto debido a que no se contó con la donación del GLA-SE por parte de la empresa IDRI.

Para la formulación de NH36r con MLA se utilizaron 10 µg de adyuvante, con base en los resultados obtenidos en candidatos a vacuna para la leishmaniasis.^{83,184}

Cabe mencionar que en los grupos experimentales se utilizaron 7 ratones BALB/c y en los grupos control en la evaluación de la protección se emplearon 5 ratones.

6.4 Definición de las variables y escalas de medición

La descripción de las variables analizadas en el presente estudio, se incluye en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables y escalas de medición

<i>Variable</i>	Definición	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Unidad de medición
<i>IgG total</i>	Anticuerpo de tipo IgG total específico de NH36r	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Densidad óptica
<i>IgG1</i>	Anticuerpo subtipo IgG1 específico de NH36r	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Densidad óptica
<i>IgG2a</i>	Anticuerpo subtipo IgG2a específico de NH36r	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Densidad óptica
<i>LT CD4+ IL4</i>	Linfocitos TCD4+ productores de IL4 en la población total de esplenocitos.	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Porcentaje (%) de células positivas
<i>LT CD4+ IFN-γ</i>	Linfocitos TCD4+ productores de IFN-γ en la población total de esplenocitos	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Porcentaje (%) de células positivas
<i>LT CD8+ IL4</i>	Linfocitos TCD8+ productores de IL4 en la población total de esplenocitos.	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Porcentaje (%) de células positivas
<i>LT CD8+ IFN-γ</i>	Linfocitos TCD8+ productores de IFN-γ en la población total de esplenocitos.	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Porcentaje (%) de células positivas
<i>Tamaño de lesión</i>	Inflamación provocada por la lesión en el cojinete plantar del ratón infectado con <i>L. (L.) mexicana</i>	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	mm
<i>Carga parasitaria</i>	Carga de parásitos presentes en cojinete plantar	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Equivalente de parásitos/mg de tejido

6.5 Obtención de la vacuna

En el presente trabajo se utilizó la proteína recombinante NH36 propuesta por McAtee y colaboradores, para su obtención el gen que codifica para NH36 fue clonado en el vector pET41a utilizando los sitios NdeI/XhoI. La expresión de la proteína se hizo en *Escherichia coli* BL21, y el cultivo se realizó en presencia de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). Finalmente, la purificación se efectuó mediante cromatografía de intercambio de aniones y de filtración en gel, se verificó que la proteína obtenida tiene una pureza >99%.¹⁸⁰

La integridad de la proteína, se confirmó con electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de litio (LSD-PAGE, del inglés *lithiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), espectrometría de masas y análisis enzimáticos. La proteína obtenida está conformada por 322 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa. Se evaluó con la prueba de nucleósido hidrolasa y presentó un Km de 741 ± 246 mM.¹⁸⁰

NH36r y el adyuvante E6020-SE fueron proporcionados por el Colegio de Medicina de Baylor. El GLA-SE fue donado por la empresa IDRI.

6.6 Animales de experimentación

La evaluación de la inmunogenicidad se realizó mediante ensayos *in vivo* empleando ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos del Centro UNAM-Harlan de producción de animales de laboratorio. Esta cepa consanguínea fue empleada por ser susceptible a la infección por parásitos del género *Leishmania*.¹⁸⁵

Para la evaluación de la protección, se emplearon ratones BALB/c hembras de 14-15 semanas de edad que fueron proporcionados por la empresa Biología Integral de Vertebrados (BIOINVERT).

Los ratones permanecieron en el área de experimentación animal del CIR Unidad Biomédica, fueron alojados en jaulas con viruta estéril a una temperatura de 24 ± 3 °C y un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Diariamente se les proporcionó alimento para ratón (LabDiet®) y agua a libre demanda. Cada 5-6 días, se realizó

cambio de viruta añadiendo en la jaula tubos de cartón y papel (sin olor y estériles) como enriquecimiento ambiental, con el fin de reducir el estrés provocado por la manipulación durante el experimento.

6.7 Inmunización

La inmunización se realizó mediante dos vías: i.m e i.d. Los ratones fueron inmunizados vía i.m en el músculo cuádriceps derecho. Mientras que la vacuna administrada por vía i.d se aplicó en la dermis de las orejas, distribuyendo la mitad de la dosis de vacuna en cada oreja. Para el manejo apropiado de los animales se anestesiaron con una dosis única de pentobarbital sódico (50 µg/g de peso) vía i.p.

Con el objetivo de generar una reestimulación del sistema inmune, se aplicaron dos refuerzos en intervalos de dos semanas.¹⁸⁰

Después del último refuerzo, los experimentos posteriores se realizaron en ciego, con el fin de evitar sesgos.

6.8 Determinación de los niveles de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a específicos de NH36r

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por la administración i.d e i.m de la vacuna, dos semanas después de la tercera inmunización se recuperó aproximadamente 1 mL de sangre vía punción cardiaca. Para la obtención de suero, la sangre se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 37 °C.

La cuantificación de anticuerpos se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos y se emplearon microplacas de 96 pozos. Las placas fueron sensibilizadas con la proteína NH36r en amortiguador de carbonatos pH 9.6. La concentración de proteína utilizada fue de 2.5 µg/mL y 10 µg/mL para la determinación de IgG totales y sus subtipos, respectivamente. La placa se incubó a 4 °C por 16-20 h. Como control de la técnica, se empleó un blanco, para el cual la sensibilización con la proteína se realizó a las mismas condiciones a las que las muestras fueron evaluadas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 μ L de amortiguador de bloqueo (PBST (PBS 10x pH 7.2 y Tween 20 al 0.01%) + BSA al 0.1%), incubando a 24 °C por 2 h. Posteriormente, se realizaron cinco lavados PBST.

Los sueros de cada grupo experimental, se prepararon en amortiguador de muestra (PBS 1x + BSA al 0.3%) a una dilución 1:200 para la evaluación de IgG, y 1:100 para el análisis de los subtipos IgG1 e IgG2a. Se adicionaron 100 μ L por pozo de la muestra y se incubó a 24 °C por 1 h. Finalizada la incubación, se realizaron cinco lavados con PBST. Las muestras fueron evaluadas por triplicado. Como control negativo se utilizó el suero de un ratón sano. Como control positivo se empleó el suero de ratones inmunizados con 3 dosis de NH36 (5 μ g), el cual fue previamente titulado en el laboratorio y propuesto como control positivo de las muestras, al demostrar tener niveles altos de anticuerpos específicos contra NH36 (D.O de 0.9-0.8).

Posteriormente, se emplearon los anticuerpos de ratón anti-IgG (Sigma Aldrich, No. de catálogo A5153) y los subtipos anti-IgG1 (Sigma Aldrich, No. de catálogo SAB3701172) y anti-IgG2a (Sigma Aldrich No. de catálogo SAB3701179) marcados con fosfatasa alcalina, los cuales fueron preparados a una dilución 1:4000 en PBS 1x. Se añadieron 100 μ L de anticuerpo por pozo y se incubó a 24 °C por 30 min. De igual manera, se realizaron cinco lavados con PBST. En seguida, se efectuó un lavado con PBS 10x y se agregó el sustrato revelador p-nitrofenilfosfato (Sigma Aldrich, No. de catálogo S0942-200TAB) a una concentración de 1 mg/mL diluido en amortiguador de dietanolamina pH 9.8 (dietanolamina 1 M y $MgCl_2$ 0.5 mM). A cada pozo se le adicionaron 200 μ L de dicho sustrato y se incubó a 24 °C por 30 min en ausencia de luz. Finalmente, la reacción se detuvo con 50 μ L de NaOH 3N y la lectura se realizó a 405 nm en el lector de placas de ELISA Modelo 680 (ThermoFisher). El valor obtenido de densidad óptica (D.O.) fue directamente proporcional a los niveles de IgG totales, IgG1 e IgG2a producidos en el ratón.^{6,180}

6.9 Aislamiento de esplenocitos de ratón

El bazo se extrajo quirúrgicamente en condiciones asépticas, se maceró lentamente y filtró empleando una malla de $125 \mu\text{m}^2$ de poro y el émbolo de una jeringa como pistilo. Durante la filtración, se drenó de forma continua con aproximadamente $100 \mu\text{L}$ RPMI 1640. El filtrado fue llevado a un volumen de 15 mL de medio. Para la eliminación de restos de tejido, se realizó un lavado, centrifugando a $200 \times g$ por 12 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de solución de lisis (Tris 0.17 M y NH_4Cl 0.16 M) y se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min con agitación constante, esto con el fin de eliminar los eritrocitos presentes en el filtrado. Las células fueron lavadas tres veces con RPMI 1640 centrifugando a $200 \times g$ por 12 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, para después ser resuspendidas en 1 mL de RPMI 1640 enriquecido (RPMI 1640 al 10% de suero fetal de bovino y 100 U de penicilina/ 100 mg/mL de estreptomicina. Finalmente, para determinar la viabilidad y el número de células obtenidas, las células se tiñeron con azul de tripano al 0.4% empleando una dilución 1:100. La cuantificación se realizó en los cuadrantes de la cámara de Neubauer señalados con color rojo en la figura 2.^{180,186}

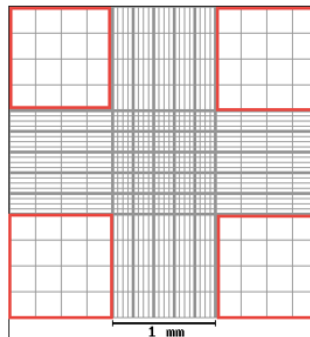


Figura 2. Retícula de cámara de Neubauer para la cuantificación de esplenocitos.

Para la obtención del número de esplenocitos viables o no viables, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Número de esplenocitos/mL} = (\bar{x}) (\text{factor de dilución})(10000)$$

En donde:

\bar{x} : Promedio de células viables o no viables presentes en los cuatro cuadrantes.

10000: Representa la conversión del volumen de la cámara a mL de los cuadrantes observados.

Factor de dilución: dilución utilizada para contar (1:100).

La viabilidad celular se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{número de células viables}}{\text{número total de células}} \times 100$$

6.10 Estimulación *in vitro* de esplenocitos con NH36r

Para la estimulación *in vitro* de los esplenocitos, se utilizaron microplacas de cultivo de 96 pozos. Se adicionaron 2×10^5 células por pozo, las cuales fueron estimuladas con 25 $\mu\text{g/mL}$ de NH36r. Como control positivo, las células se estimularon con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Concanavalina A al ser un mitógeno de linfocitos T y como control negativo se utilizaron 100 μL de RPMI 1640 enriquecido. Las muestras fueron evaluadas por triplicado. El cultivo se incubó por 22 h a 37 °C. Finalmente, para inhibir el transporte intracelular de proteínas, 4 h antes de finalizar la incubación se adicionó Brefeldina A (BD Golgi Plug, No. catálogo 51-2301KZ) a una concentración de 1 $\mu\text{L/mL}$ de cultivo.¹⁸⁰

6.11 Determinación de linfocitos T antígeno-específicos productores de IFN- γ e IL-4

Las células estimuladas fueron recolectadas de las placas de 96 pozos y se colocaron en tubos de citometría de flujo. Los pozos fueron lavados dos veces con 200 μL de PBS 1x pH 7.3, con el fin de recolectar células restantes. Los tubos con las células se centrifugaron a 400 x g por 5 min, decantando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1x centrifugando a las condiciones anteriores.

Para el marcaje extracelular se emplearon anticuerpos monoclonales de anti-CD3⁺, anti-CD4⁺ y anti-CD8⁺ marcados con los fluorocromos Alexa Fluor 647 (BD PharMingen No. de catálogo 557869), PE-Cy7 (BD PharMingen No. de catálogo 552775) y PerCPCy-5.5 (BD PharMingen No. de catálogo 551162), respectivamente. Las células con los anticuerpos se incubaron por 20 min a 4 °C en ausencia de luz. Después, se realizaron dos lavados con 2 mL de FACS. Posteriormente, se añadieron 100 µL de paraformaldehído al 4%, incubando por 10 minutos a 4 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó un lavado con 2 mL de FACS. Seguidamente, a cada condición se le adicionaron 100 µL de una solución con saponina, BSA y azida de sodio al 0.01% diluidos en FACS, y se dejaron en incubación por 20 minutos a 4 °C en ausencia de luz. En seguida, se realizó un lavado con 1 mL de FACS.^{180,186}

Para la tinción intracelular se adicionaron los anticuerpos monoclonales anti-IL-4 marcado con PE (BD PharMingen No. de catálogo 554435) y anti-IFN-γ marcado con Alexa Fluor 488 (BD PharMingen No. de catálogo 557724), incubando por 20 min a 4 °C en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo, se hicieron dos lavados con 2 mL de FACS. Finalmente, se añadieron 100 µL de paraformaldehído al 4% y los tubos fueron almacenados a 4 °C en oscuridad, hasta la adquisición en el citómetro de flujo BD FACSVerse™ (BD Biosciences). Previo a la adquisición, se realizó un lavado con 2 mL de FACS centrifugando de igual manera a 400 x g por 5 min y se resuspendió en 500 µL de FACS. Para el análisis, 10, 000 células/muestra fueron adquiridas.^{180,186}

El análisis de las poblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN-γ e IL-4 se realizó con el programa FlowJo vX 0.7. Es importante mencionar que previo al análisis de las muestras, se evaluó la autofluorescencia de células sin teñir, con el fin de descartar la fluorescencia por inespecificidad.

Los datos se presentaron como porcentaje de células TCD4⁺ y TCD8⁺ productoras de las citocinas IFN-γ e IL-4. Cabe mencionar que para el análisis de estas poblaciones, el efecto basal o la frecuencia obtenida del control negativo (RPMI enriquecido) se eliminó de la frecuencia de células que fueron estimuladas

in vitro con NH36, con el objetivo de evaluar la respuesta celular inducida por la administración i.d e i.m de la vacuna.

6.12 Infección experimental con *Leishmania (L.) mexicana*

La cepa *L. (L.) mexicana* (MHET/MX/97/Hd18) se conservó mediante pases sucesivos *in vivo* en un hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Se obtuvieron parásitos a partir de la debris de la pata infectada y fueron cultivados en medio 199 suplementado (suero fetal bovino al 20%, 2-mercaptoetanol 5 μ M, piruvato de sodio 20 mM, 100 U de penicilina/ 100 mg/mL de estreptomycin y urea al 2.5%), incubando a 25 ± 2 °C. Posteriormente, se realizaron dos pases sucesivos en medio 199 suplementado al 15% de suero fetal bovino, con el objetivo de eliminar la contaminación por eritrocitos y obtener promastigotes metacíclicos viables.^{187,188}

Para la infección, el cultivo de parásitos en fase estacionaria se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS 1x estéril, centrifugando a 3000 rpm por 5 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de PBS 1x. Seguidamente, los parásitos fueron cuantificados en cámara de Neubauer a una dilución de 1:100, empleando paraformaldehído al 0.05%.¹⁸⁹

El conteo se efectuó en los cuatro cuadrantes señalados en la retícula de la cámara de Neubauer de la figura 2. El número de parásitos se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Número de parásitos/mL} = (\bar{x}) (\text{factor de dilución})(10000)$$

En donde:

\bar{x} : Promedio del número de parásitos presentes en los 4 cuadrantes.

10000: conversión del volumen de la cámara a mL de los cuadrantes observados.

Factor de dilución: dilución utilizada para contar (1:100).

Finalmente, los ratones fueron infectados con 1×10^6 promastigotes vía s.c en el cojinete plantar derecho.^{6,180}

6.13 Evaluación del desarrollo de la lesión

El desarrollo de la lesión fue monitoreado midiendo con un vernier la inflamación del cojinete plantar cada 7 días durante 13 semanas. La inflamación provocada por la infección se obtuvo con la diferencia del grosor del cojinete plantar derecho o infectado menos el grosor del cojinete plantar izquierdo (no infectado).^{180,186}

Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Asimismo, se establecieron como puntos de corte el desarrollo de una inflamación superior a 7 mm y la presencia de necrosis en la pata infectada.

6.14 Determinación de la carga parasitaria

Se utilizaron 25-30 mg de tejido proveniente del cojinete plantar de 13 semanas post-infección, se maceró en condiciones asépticas y se extrajo ADN genómico empleando el Kit de purificación Wizard® (Promega Madison WI) siguiendo las especificaciones del fabricante.¹⁸⁸

La carga parasitaria se determinó por qPCR. Para la amplificación de la secuencia de 140 pb del minicírculo del cinetoplasto *L. (L.) mexicana* se utilizaron los cebadores: 5'-AATGCGAGTGTTGCCCTTTTG-3' y 5'-GCCGAACAACGCCATATTAACC-3'. Para la reacción, se utilizaron 50 ng de ADN, 500 nM de cada cebador y SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 1x (Bio-Rad No. De catálogo 1725271), en un volumen final de 20 µL. Se empleó el termociclador Illumina® Eco™ y las condiciones de reacción fueron 10 min de activación a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C, al final se hizo un análisis de alta resolución de fusión. La curva estándar consistió en diluciones seriadas a partir de 1.5x10⁶ parásitos, realizadas con ADN de tejido de ratón sano y ADN de parásito. Cada muestra y los estándares se evaluaron por triplicado y en cada ciclo de amplificación se incluyeron tres controles negativos. La desviación estándar entre los triplicados fue menor a 0.6 Cq. Los resultados se analizaron en el programa EcoSoftware.^{188,190}

6.15 Análisis estadístico

La comparación entre grupos con datos paramétricos, se efectuó empleando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tukey. Para la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Los datos fueron presentados como media y error estándar.

Para datos no paramétricos, los grupos fueron comparados utilizando la prueba Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Dunns. La comparación entre dos grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney. Los datos se presentaron como mediana y rango.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad PRISMA®. En el presente trabajo los valores con una $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.16 Consideraciones éticas

El proyecto de investigación del que forma parte el presente trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética del CIR “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (ID: CBI-CIR-11-04). El manejo de los animales se realizó con base en la normatividad establecida en el manual de procedimientos de dicho comité.

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto de la vía de administración de NH36r en la inducción de la respuesta inmune humoral

La respuesta humoral inducida en ratones BALB/c por la administración i.d e i.m de la vacuna recombinante NH36 formulada con los adyuvantes E6020-SE o GLA-SE, se evaluó mediante la técnica de ELISA indirecta, determinando los niveles de anticuerpos IgG totales y sus subtipos IgG1 e IgG2a específicos de NH36. Asimismo, se calculó la razón de IgG2a/IgG1 al ser indicador de un perfil T_{H1} o T_{H2} .

El análisis estadístico de los niveles de anticuerpos producidos en los grupos experimentales, se realizó con la prueba ANOVA. Cuando los ratones fueron inmunizados con NH36r y E6020-SE, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las vías de administración y el control basal en la producción de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a (Figura 3). Esto indica que dicha formulación de vacuna, no genera la activación de una respuesta humoral por ninguna de las dos vías.

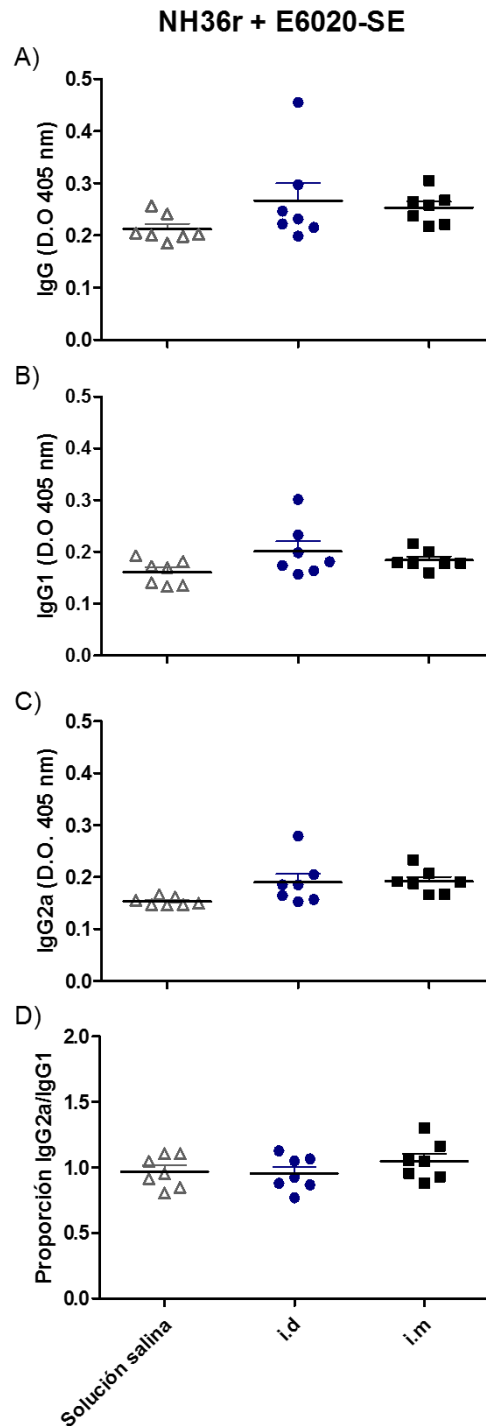


Figura 3. Niveles de anticuerpos IgG totales (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) específicos de NH36r y la proporción IgG2a/IgG1 (D) de ratones inmunizados con NH36r y E6020-SE por vía intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m). Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante la técnica de ELISA a partir del suero de ratones inmunizados. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA y *post hoc* de Tukey. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Cuando NH36r se formuló con el adyuvante GLA-SE, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG totales producidos por la administración i.d e i.m; no obstante, éstos fueron mayores a los del control salino (Figura 4A, ANOVA $P=0.0003$, Tukey $P<0.05$), demostrando la capacidad de NH36 en inducir una respuesta inmune humoral específica. Además, se observó que con la administración i.d se indujo notablemente una mayor producción del subtipo IgG1 que por vía i.m (Figura 4B, ANOVA $P<0.0001$, Tukey $P<0.05$). A pesar de no presentarse una diferencia significativa al evaluar los niveles de IgG2a (Figura 4C), al analizar la proporción de los subtipos se encontró que fue menor a 1 para la vía i.d, lo que indica un balance preferentemente tipo T_H2 . Por lo contrario, la proporción fue significativamente mayor cuando la vacuna se administró de forma i.m en comparación con la vía i.d, lo que sugiere una polarización de la respuesta hacia un perfil T_H1 (Figura 4D, ANOVA $P<0.0001$, Tukey $P<0.05$).

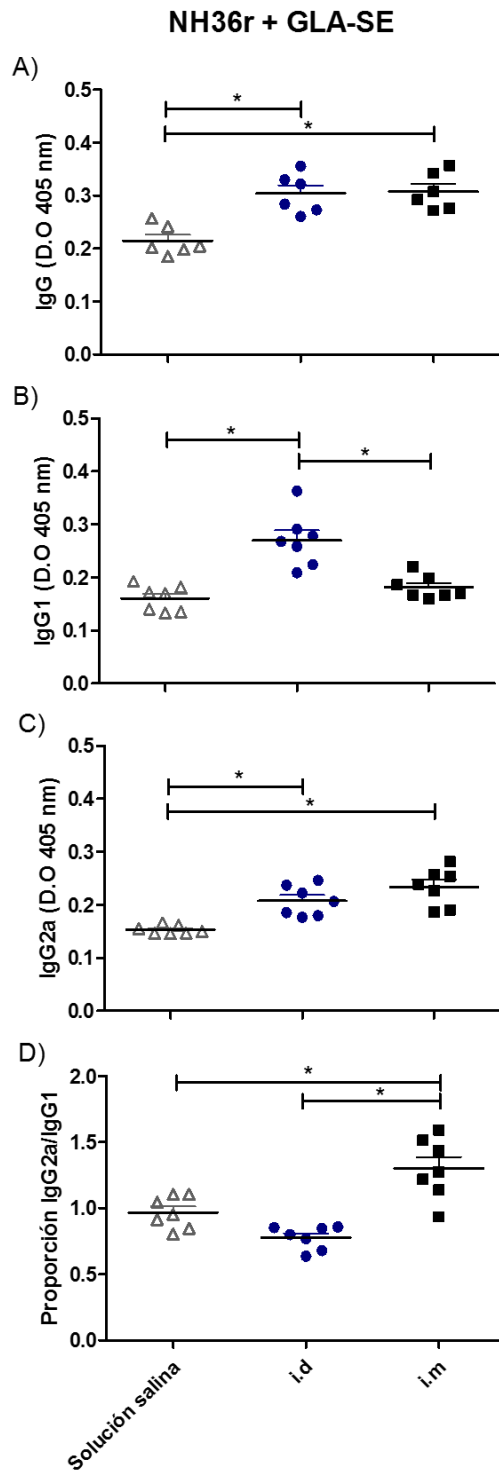


Figura 4. Niveles de anticuerpos IgG totales (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) específicos de NH36r y la proporción IgG2a/IgG1 (D) de ratones inmunizados con NH36r y GLA-SE por vía intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m). Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante la técnica de ELISA a partir del suero de ratones inmunizados. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA y *post hoc* de Tukey. *Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

7.2 Efecto de la vía de administración de NH36r en la frecuencia de linfocitos T antígeno-específicos productores de IFN- γ e IL-4

Las células extraídas del bazo de ratones inmunizados vía i.d o i.m con NH36r fueron estimuladas *in vivo* con este antígeno, para determinar la capacidad de inducir una respuesta inmune celular específica. Las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD3⁺, anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, anti-IL-4⁺ y anti-IFN γ ⁺ para su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el análisis de las poblaciones celulares, primero se utilizó una gráfica de dot-plot de tamaño contra granularidad, para seleccionar la población de linfocitos (Figura 5A). En seguida, se empleó una gráfica de área contra altura para realizar un análisis de dobletes, con el fin de seleccionar la población libre de éstos (Figura 5B). Posteriormente, mediante un histograma de fluorescencia se seleccionó la población positiva a CD3 en los linfocitos (Figura 5C). Una vez seleccionada la población de células CD3 positivas, se utilizaron gráficas de dot-plot para la selección de poblaciones de CD4 positivas y CD8 positivas (Figura 5D). Finalmente, se emplearon gráficas de dot-plot para el análisis de la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4 por las células CD8 positivas (Figura 5E) y CD4 positivas (Figura 5F).

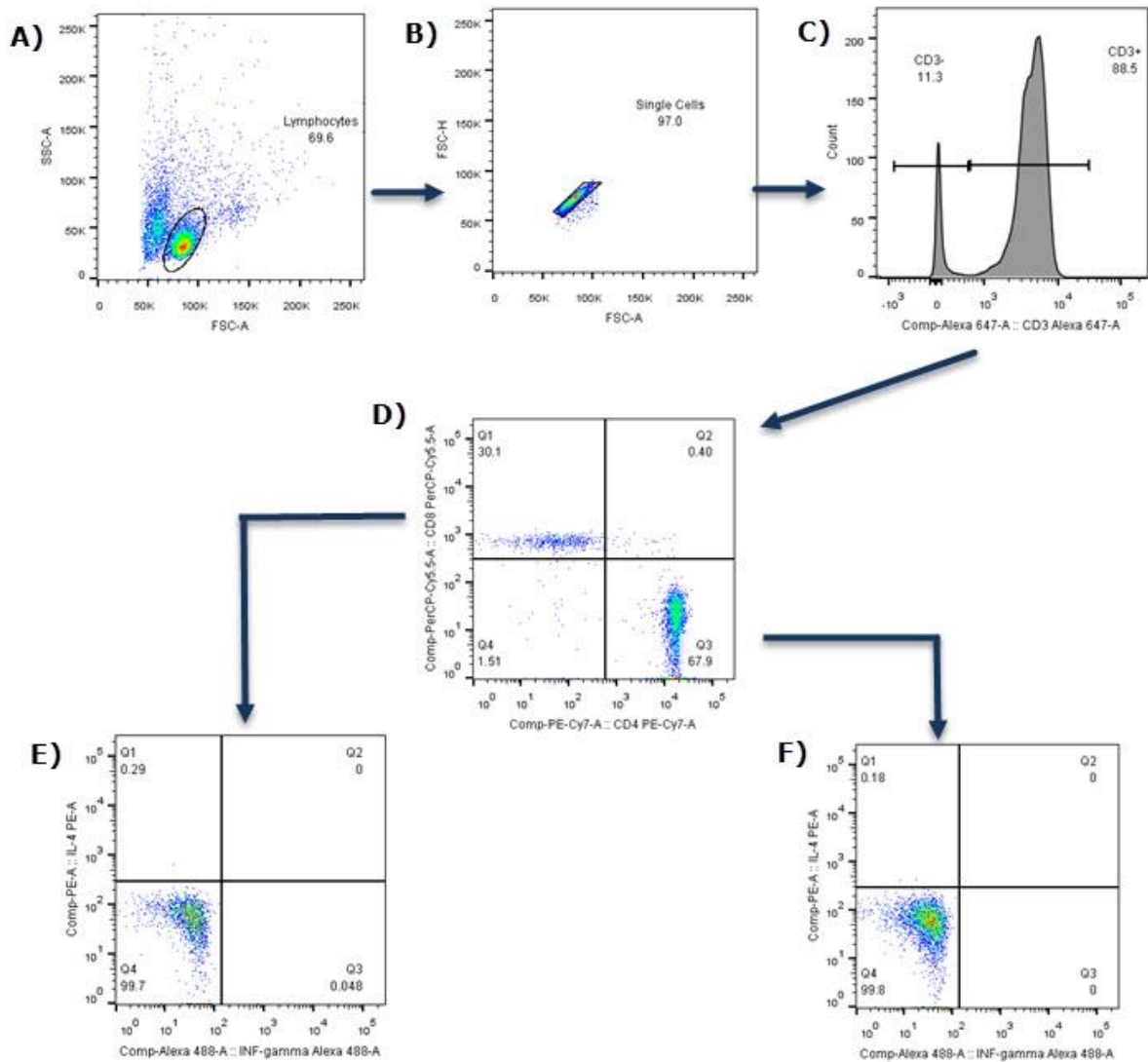


Figura 5. Estrategia para el análisis de la producción de IFN- γ e IL-4 por las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ mediante citometría de flujo, empleando el Software FlowJo vX 0.7. **A)** Gráfica de dot-plot de tamaño contra granularidad para la selección la población de linfocitos, **B)** Análisis de eliminación dobles de linfocitos, **C)** Histograma de fluorescencia de linfocitos marcados con CD3, **D)** Gráfica de dot-plot para la selección de linfocitos CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺, **E)** Gráfica dot-plot para el análisis de producción de IL-4 e IFN- γ por linfocitos CD3⁺CD8⁺, **F)** Gráfica dot-plot para el análisis de producción de IL-4 e IFN- γ por linfocitos CD3⁺CD4⁺.

El análisis de las poblaciones se realizó para cada muestra y sus controles, de manera ilustrativa en la figura 6, se exhiben los gráficos de dot-plot de IL-4 contra IFN- γ para LT CD8⁺ y CD4⁺ obtenidos a partir de células cultivadas con RPMI (control negativo), la proteína recombinante NH36 y Concanavalina A (control

positivo). Como se esperaba, se observó que las células estimuladas con NH36r tienen frecuencias mayores de LTCD4⁺ y CD8⁺ productores IFN- γ e IL-4 que las obtenidas en el control negativo, pero son menores en comparación con el control positivo.

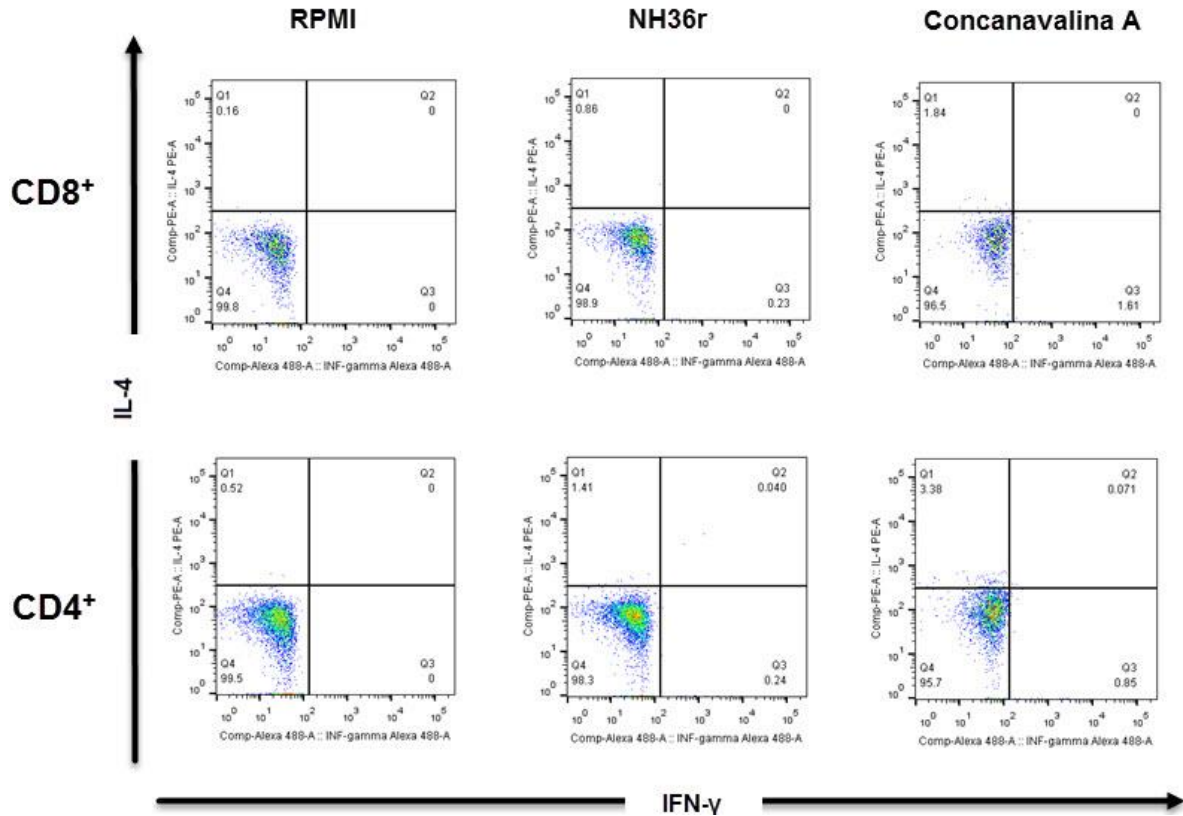


Figura 6. Gráficas de dot-plot representativas de un experimento. Se muestran los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ productores de IL-4 e IFN- γ para cada una de las condiciones de cultivo de una muestra, RPMI (control negativo), NH36r y Concanavalina A (control positivo).

Los grupos experimentales fueron analizados con la prueba de U de Mann-Whitney, no se obtuvieron las diferencias estadísticas esperadas, lo cual podría deberse al número de muestras que se lograron recuperar durante la obtención de esplenocitos; sin embargo, se observaron tendencias claras entre los grupos. Por ejemplo, después de analizar el efecto de la vía de administración de la vacuna NH36r con E6020-SE, se observó que las frecuencias linfocitarias obtenidas después de la administración i.d e i.m de la vacuna, tienden a ser

mayores que las del control salino (Figura 7); además, se encontró que los LT CD8⁺ producen significativamente más IL-4 cuando la vacuna se aplica de forma i.d que por vía i.m (Figura 7A, U de Mann-Whitney $P=0.0476$). Así también, se puede ver que con la administración i.d, ambas poblaciones de LT tienden preferentemente a producir las dos citocinas, y así como lo observado en los LT CD8⁺ esta ruta de administración promovió un incremento en la frecuencia de LT CD4⁺ productores de IL-4 (Figura 7C).

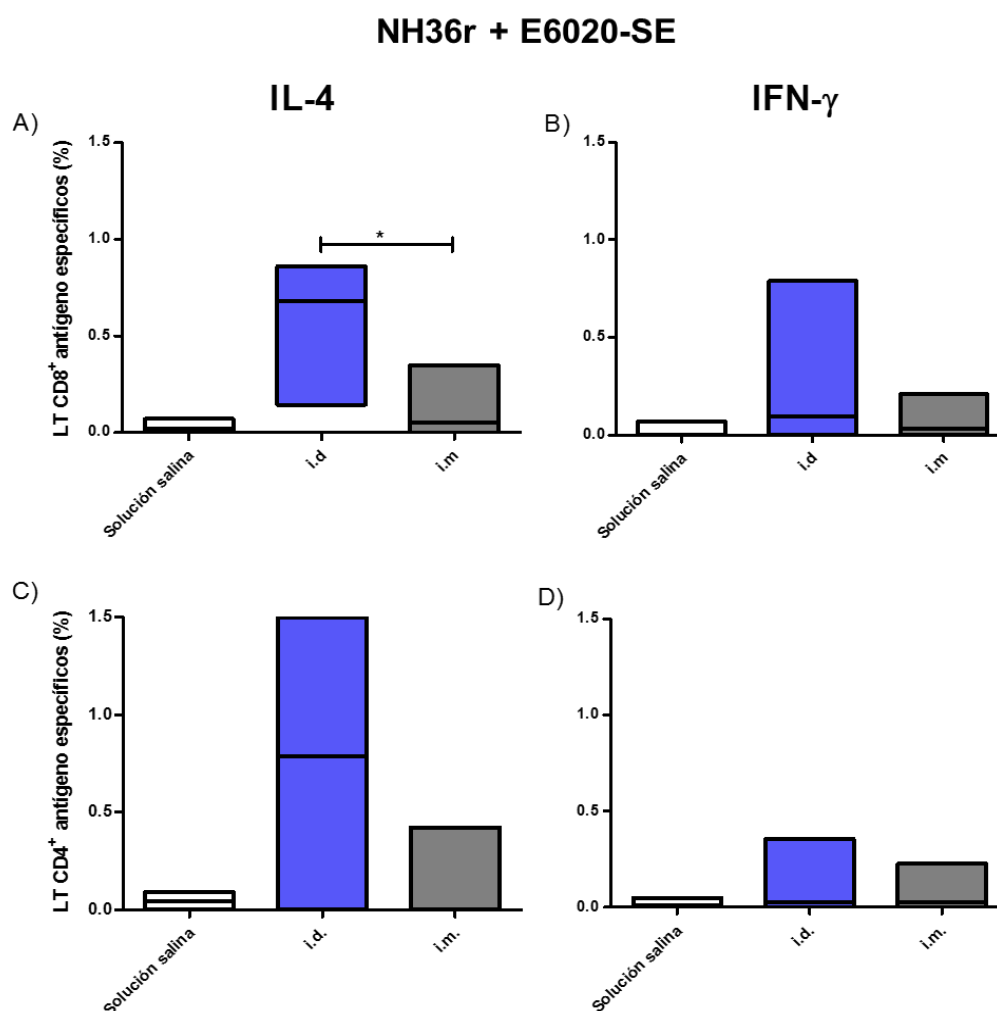


Figura 7. Frecuencia de LT CD8⁺ productores de IL-4 (A) e IFN-γ (B) y de LT CD4⁺ productores de IL-4 (C) e IFN-γ (D) inducida por la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36 y E6020-SE. La frecuencia de las poblaciones celulares se obtuvo por citometría de flujo, a partir de esplenocitos estimulados *in vitro* con NH36r. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba U de Mann-Whitney. *Diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$).

La tendencia de la vía i.d en inducir una mayor frecuencia de LT CD4⁺ productores de IL-4, también se presentó cuando NH36r se formuló con el adyuvante GLA-SE (Figura 8C). Al analizar la frecuencia de las otras poblaciones celulares, no se observaron diferencias notorias entre las rutas de administración de la vacuna, únicamente se muestra que tienden a inducir frecuencias mayores a las del control (Figura 8A, B y D).

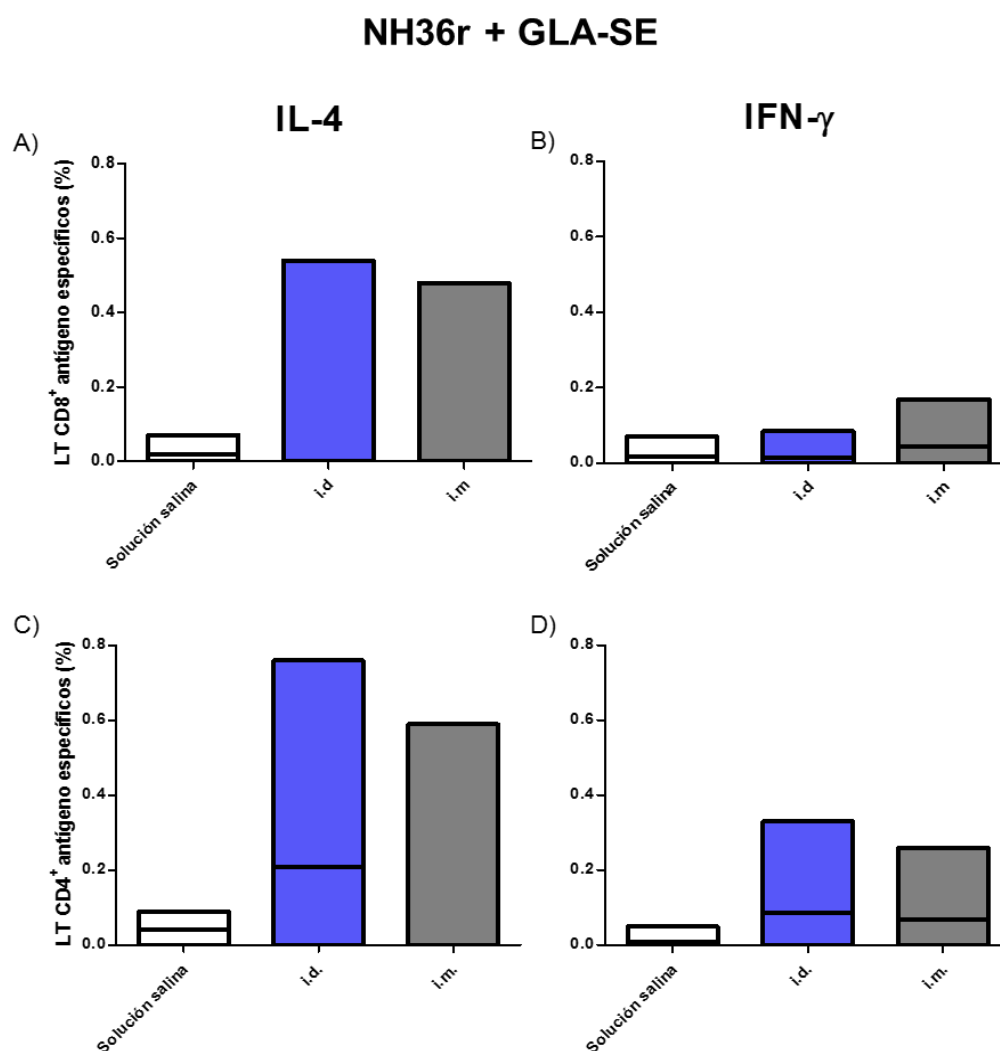


Figura 8. Frecuencia de LT CD8⁺ productores de IL-4 (A) e IFN- γ (B) y de LT CD4⁺ productores de IL-4 (C) e IFN- γ (D) inducida por la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36 y GLA-SE. La frecuencia de las poblaciones celulares se obtuvo por citometría de flujo, a partir de esplenocitos estimulados *in vitro* con NH36r. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba U de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.3 Efecto de la vía de administración de NH36r en la protección a una infección por *Leishmania (L.) mexicana*

El efecto protector inducido por la administración i.d e i.m de la proteína NH36r, se evaluó monitoreando durante 13 semanas el desarrollo de la lesión, midiendo la inflamación del cojinete plantar de ratones BALB/c provocada por la infección con 1×10^6 promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Posteriormente, se tomaron muestras de tejido del cojinete plantar para determinar la carga parasitaria presente en la lesión por qPCR.

El análisis estadístico de los grupos experimentales en el desarrollo de la lesión, se realizó por cada semana mediante la prueba t de Student. Al analizar el desarrollo de la lesión de los ratones inmunizados con NH36r más E6020-SE, se encontró que la inflamación incrementó notoriamente a partir de la semana 3 en todos los grupos evaluados, interesantemente, el grupo de ratones en el cual la vacuna se administró por vía i.d tuvo una lesión significativamente mayor al de su control salino (t de Student $P=0.0337$), dicho comportamiento se mantuvo en las semanas 4, 5 y 6 (t de Student $P=0.0203$, $P=0.0013$, $P=0.0107$, respectivamente) (Figura 9). A partir de la semana 7, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos, ya que la inflamación en el control salino incrementó y la del grupo inmunizado por vía i.d disminuyó ligeramente; no obstante, se observa una tendencia en la que la inflamación sigue siendo menor en el grupo control. Esta tendencia se mantuvo hasta el final del experimento, asimismo, dicho comportamiento se observó entre el grupo inmunizado vía i.m y su control salino.

En el estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre las vías de administración i.d e i.m de NH36r más E6020-SE, su comportamiento fue similar durante el desarrollo de la lesión, solamente en las semanas 4, 9 y 10 se observó una tendencia notoria en la que la inflamación en ratones inmunizados vía i.m fue menor a la de los inmunizados de forma i.d.

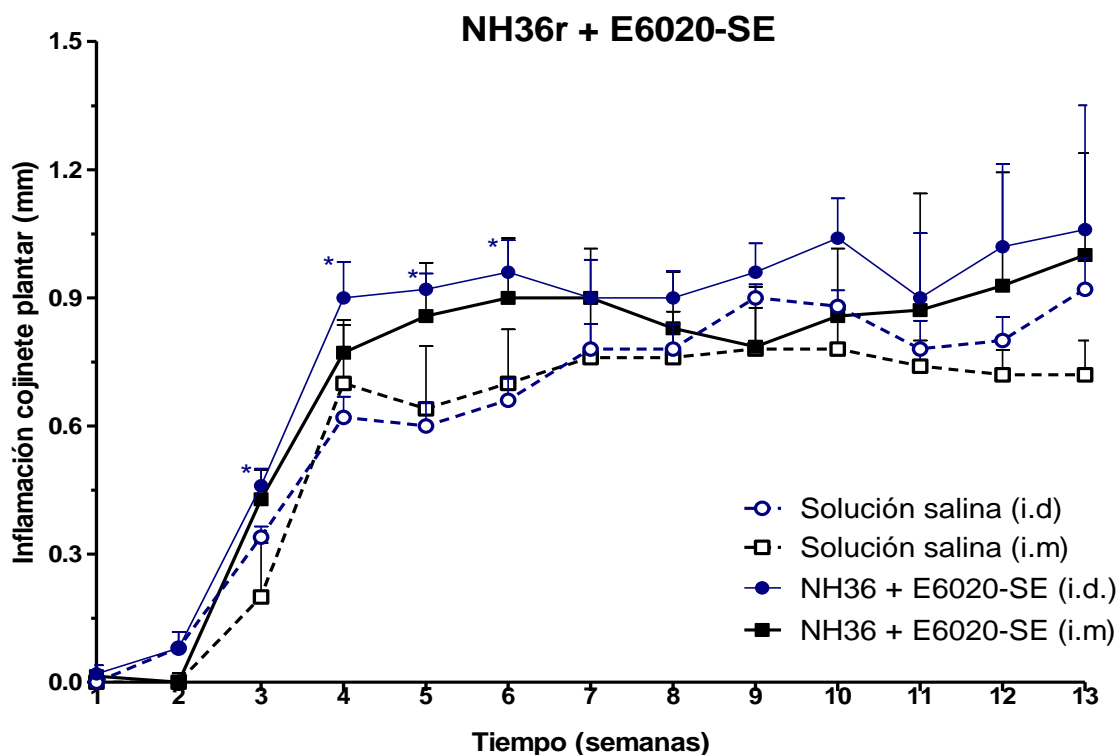


Figura 9. Efecto en la protección contra *Leishmania (L.) mexicana* en el desarrollo de la lesión, inducido por la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36 y E6020-SE. Dos semanas posteriores a la última inmunización, los ratones fueron infectados con 1×10^6 promastigotes en el cojinete plantar y la inflamación producida por la infección se midió durante 13 semanas. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student. *Diferencia estadísticamente significativa con el control salino ($P < 0.05$).

La carga parasitaria presente en la lesión de los diferentes grupos evaluados, se analizó a través de la prueba t de Student. Cabe mencionar que dos animales murieron del grupo vacunado con NH36r más E6020-SE por vía i.d, durante los procesos de inmunización que requerían de anestesia; por lo tanto, es posible que esto interfiriera en la significancia de los datos de dicho grupo.

Al analizar el efecto de las vías de administración de NH36r más E6020-SE sobre la carga parasitaria, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, como se exhibe en la figura 10. Sin embargo, se puede observar una tendencia similar a la que se presentó en la semana 13 post-infección cuando se evaluó el desarrollo de la lesión (figura 9), ya que la media de la carga

parasitaria presente en los grupos inmunizados vía i.d e i.m es mayor a la de sus respectivos controles. Como se mencionó, en este experimento no existe una diferencia significativa entre la administración i.d e i.m de la vacuna, pero se encontró que en el grupo inmunizado vía i.d, un ratón tuvo el mayor número de parásitos de todos los grupos, lo que originó que la media de este grupo sea mayor a la del grupo inmunizado vía i.m.

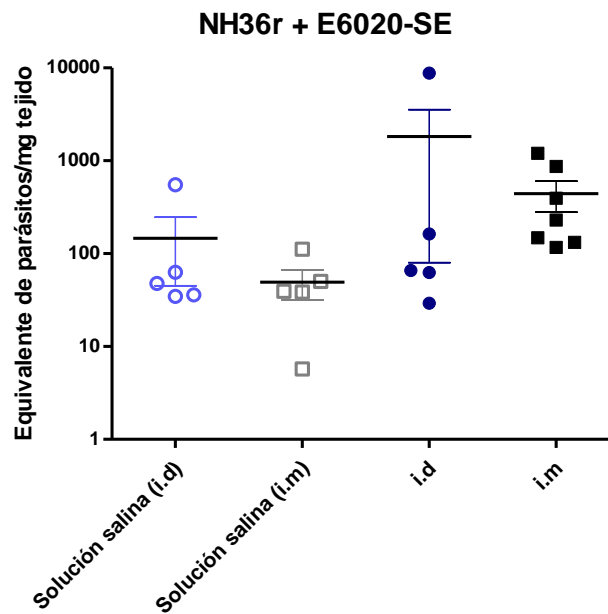


Figura 10. Efecto de la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36r formulada con E2020-SE en la carga parasitaria del cojinete plantar después de 13 semanas post-infección con *Leishmania (L.) mexicana*. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Al evaluar el efecto de la vía de administración de NH36r más el adyuvante MLA en el desarrollo de la lesión, se muestra que a partir de la semana 3 la inflamación en todos los grupos incrementa por igual, aunque en la semana 4 el grupo inmunizado con la vacuna de forma i.m tuvo una mayor inflamación, en la semana 5 todos los grupos exhibieron una inflamación similar, manteniéndose este efecto por 3 semanas (Figura 11). A partir de la semana 9, se puede observar que los

grupos que fueron inmunizados con la vacuna tuvieron inflamaciones sutilmente menores a las de sus controles, comportamiento que se mantuvo hasta la semana 13.

Como se puede observar en la figura 11, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las vías; no obstante, es notoria una tendencia en la que a partir de la semana 10, la vacuna aplicada de forma i.m reduce el tamaño de la lesión en comparación con la inmunización por vía i.d, manteniéndose dicho efecto hasta el final del experimento.

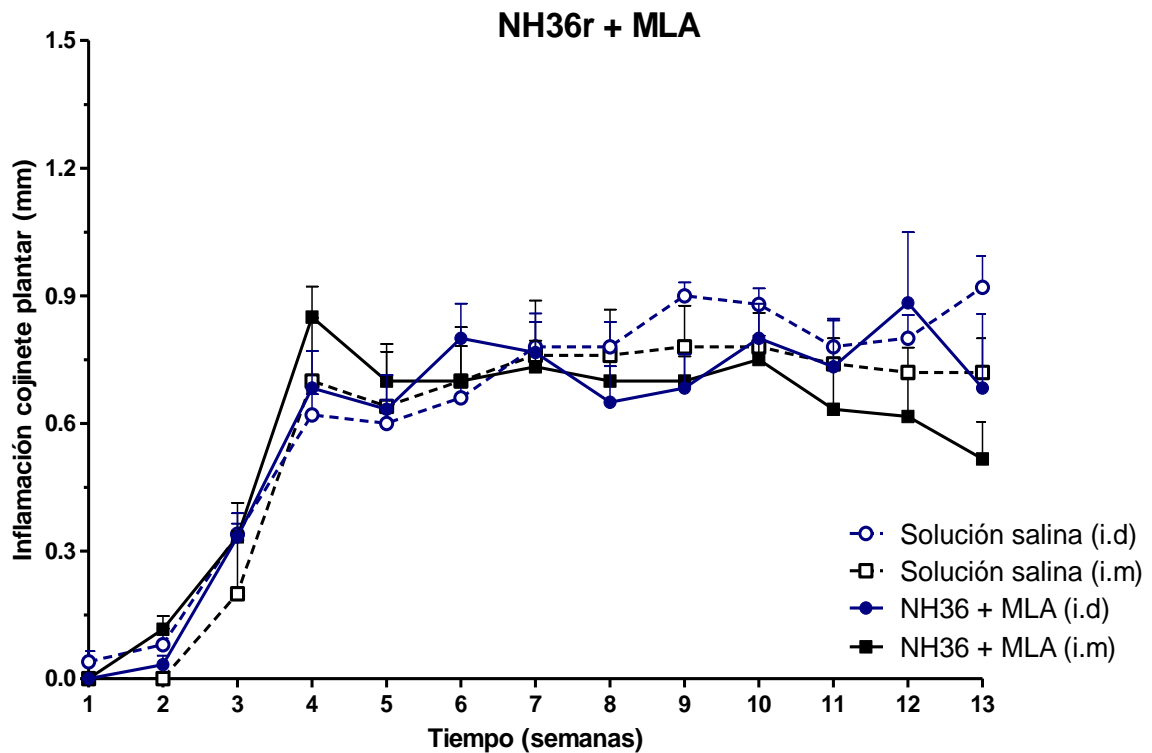


Figura 11. Efecto en la protección contra *Leishmania (L.) mexicana* en el desarrollo de la lesión, inducido por la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36 y MLA. Dos semanas posteriores a la última inmunización, los ratones fueron infectados con 1×10^6 promastigotes en el cojinete plantar y la inflamación producida por la infección se midió durante 13 semanas. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En los resultados de carga parasitaria, aun cuando no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ni tendencias claras, se observó que al menos un ratón inmunizado por vía i.m y dos por vía i.d, presentaron menos de un parásito en el cojinete plantar, lo que indica que la vacuna NH36r más MLA favoreció la reducción de la carga parasitaria (Figura 12).

Por lo tanto, los resultados obtenidos señalan que la administración i.d e i.m de la vacuna formulada con NH36r más E6020-SE o MLA, tienen un efecto similar en el desarrollo de la lesión y en la carga parasitaria.

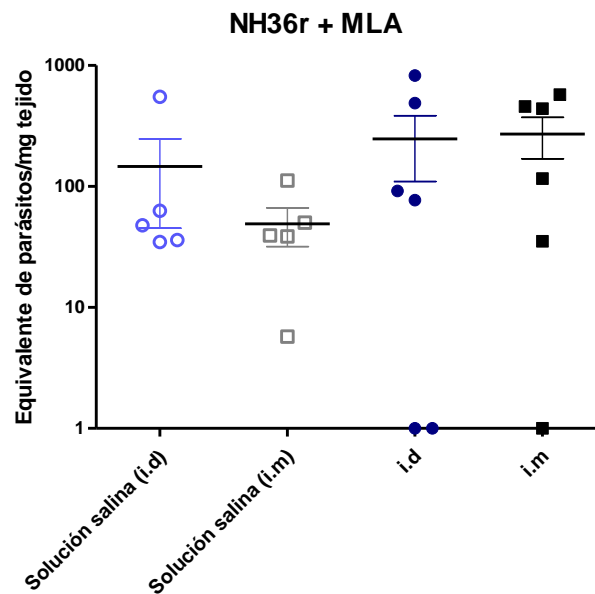


Figura 12. Efecto de la administración intradérmica (i.d) e intramuscular (i.m) de NH36r formulado con MLA en la carga parasitaria del cojinete plantar después de 13 semanas post-infección con *Leishmania (L.) mexicana*. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

VIII. DISCUSIÓN

La vía de administración utilizada en la aplicación de una vacuna ha demostrado ser factor importante en la respuesta inmune inducida; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el efecto de la administración i.m e i.d del antígeno NH36r formulado con adyuvantes derivados de lípido A en ratones BALB/c, partiendo de la idea de que las diferentes propiedades inmunológicas y anatómicas de la piel y el músculo pueden influir en la inducción de una respuesta inmune protectora ante una infección por *L. (L.) mexicana*.

Los resultados obtenidos en la respuesta inmune humoral inducida en cada una de las vías utilizadas mostraron que, la administración i.m generó una mayor proporción de anticuerpos IgG2a sobre IgG1 en comparación con la vía i.d, lo cual alcanzó a ser significativo cuando la proteína NH36r se formuló con el adyuvante GLA-SE. Esto indica que por esta vía se favorece una respuesta de tipo T_{H1}, respuesta inmune que ha demostrado ser protectora a una infección por *Leishmania*. Mientras que la administración i.d de la vacuna, promovió la producción de anticuerpos del subtipo IgG1, respuesta asociada a un perfil de tipo T_{H2}. Estos resultados son similares a los obtenidos por Boyle y colaboradores, quienes evaluaron la respuesta inmune activada por la administración i.d e i.m de la proteína ovoalbúmina (OVA) en ratones BALB/c.^{43,191}

La diferencia en los perfiles de la respuesta inmune encontrados en este estudio puede deberse a la presencia de células diferentes en piel y músculo. Por ejemplo, las células de Langerhans, presentes en la piel, pueden estar involucradas en la respuesta humoral inducida después de la administración i.d de la vacuna, al estar relacionadas con la producción de anticuerpos IgG1. Este tipo de respuesta también se obtuvo por McAtee y colaboradores, quienes evaluaron la administración i.d de NH36r más GLA-SE, aunque a dosis diferentes a las del presente trabajo. Sin embargo, dichos resultados contrastan con la respuesta humoral inducida por la administración i.d de LEISH-F3 formulado con

GLA-SE, la cual favoreció la producción de anticuerpos de tipo IgG2a, a pesar de utilizar el mismo adyuvante, ruta de inmunización y modelo animal. Lo que demuestra que así como la vía de administración, el tipo de antígeno influye en la orientación de la respuesta inmune, tal como concluyen Pertmer y colaboradores.^{95,155,180,192}

Por otra parte, se ha reportado que en el músculo residen menos CPAs especializadas que en la piel. No obstante, las células dendríticas residentes en el tejido muscular han demostrado ser capaces de activar de forma eficiente a los LT. Además, otras células dendríticas, como las derivadas de monocitos, obtienen esta eficacia si se administran estímulos como el LPS, ya que incrementa la migración hacia los nódulos linfáticos y el reconocimiento de los antígenos. Es importante recalcar que dichas células se caracterizan por tener una mayor capacidad de inducir LT productores de IFN- γ en comparación con los otros tipos de células dendríticas presentes en el músculo. Por lo que es posible que el uso de adyuvantes derivados de lípido A induzca la activación de estas células, de modo que su acción se haya reflejado en nuestros resultados, al promover el cambio de isotipo hacia anticuerpos IgG2a. Igualmente, existe la posibilidad de que los adyuvantes, también estuvieran involucrados en el reconocimiento de los TLR-4 presentes en los mioblastos, cuya unión con los receptores, promoviera un incremento de la respuesta inflamatoria local.^{169,193,194}

Adicionalmente, el adyuvante y la lesión provocada por la inyección, al originar un reclutamiento celular, inducen la producción de citocinas, las cuales pudieran haber actuado sobre los mioblastos, ocasionando que actúen como CPAs locales. Estas células han demostrado tener la capacidad de activación y proliferación de LT CD4⁺, sin embargo, otros estudios apuntan que su acción de CPAs más que iniciar una respuesta inmune adaptativa, está relacionada con mantener la respuesta inducida en el músculo. Esto nos indica que es probable que dichas células tengan una participación importante en la respuesta inmune

inducida por la administración i.m de nuestra vacuna, a pesar de no ser CPAs especializadas.¹⁹⁵⁻¹⁹⁸

Otro factor que pudiera estar involucrado en la diferencia en la respuesta inmune obtenida por las vías i.d e i.m, es el efecto de depósito. Se ha documentado que por ambas rutas existe una permanencia del antígeno en la zona de inoculación. Incluso, en un estudio al evaluar la persistencia de la vacuna MVA se encontró que el antígeno permanece de 4 a 48 h en los sitios de la piel y músculo, donde se aplicó la vacuna. En dicho experimento no se evaluó el tiempo hasta que MVA ya no era detectable; no obstante, se encontró que la expresión de la proteína fluorescente para detectar MVA, se asoció principalmente a las fibras musculares. Asimismo, cabe mencionar que el efecto de depósito pudo haber sido incrementado por los adyuvantes evaluados en el presente estudio, al ser preparados en emulsión. Por lo cual, es posible que lo anterior explique la inmunogenicidad de aplicar la vacuna de forma i.m, ya que al permanecer en mayor proporción y por más tiempo en el sitio, la liberación lenta del antígeno incrementara la posibilidad de que éste sea capturado por las CPAs, a pesar de que en el músculo residan pocas de estas células.^{159,168,171,199}

Otra de las diferencias observadas entre la vía i.d e i.m en cuanto a las CPAs fue reportada por Abadie y colaboradores, quienes al administrar la vacuna MVA vía i.d en un modelo murino, observaron un mayor reclutamiento de CPAs en los nódulos linfáticos aferentes, respuesta que no se obtuvo con la administración en el músculo. Esto, lo relacionaron con las respuestas de LT CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicos en bazo y nódulos linfáticos, al ser mayores por vía i.d. Dichos resultados, concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio, ya que se encontraron mayores frecuencias de LT antígeno-específicos en el bazo, después de la administración i.d de NH36r en comparación con la administración i.m.¹⁶⁸

En el presente trabajo, los resultados obtenidos al evaluar la respuesta inmune celular inducida por las vías de administración, están relacionados con los

obtenidos en la respuesta humoral, debido a que se pudo observar que en el grupo experimental inmunizado con la formulación elaborada con el adyuvante E6020-SE, se incrementó la proporción de linfocitos T CD8⁺ productores de IL-4, los cuales son linfocitos que al activarse en presencia de IL-4, pierden su citotoxicidad y desarrollan la capacidad de producir citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, pero no IFN- γ , en consecuencia incrementan las respuestas T_H2. Esto contrasta con los reportes que indican que la administración i.d, favorece la activación de LT CD8⁺ productores de IFN- γ y que por lo general activa una respuesta T_H1. Sin embargo, Boyle y colaboradores, obtuvieron resultados similares a los nuestros, puesto que encontraron que la producción de IL-4 sólo se presentó cuando la proteína OVA se aplicó vía i.d en ratones BALB/c. Además, a pesar de que la producción de IFN- γ fue equivalente en ambas vías, como lo observado en este estudio con NH36r, se encontró que la vía i.d favorece la producción de anticuerpos del subtipo IgG1, lo que señala la importancia de IL-4 en la orientación de la respuesta inmune. Por lo tanto, la tendencia de la administración i.d de NH36r más GLA-SE en producir mayores frecuencias de LT CD4⁺ IL4⁺, nos permite considerar que la citocina IL-4 presente en el medio pudo ser suficiente para promover el cambio de isotipo de anticuerpos hacia el subtipo IgG1.^{7,191,200–202}

La polarización hacia T_H2 observada después de la administración en la piel, puede deberse a distintos eventos tales como, no presentarse una inflamación considerable, que el antígeno active a macrófagos y células dendríticas para producir más IL-4 que IFN- γ , o que los LT CD4⁺ estimulados por el antígeno hayan secretado pequeñas cantidades de IL-4 en su activación inicial.⁴⁴

Así también, otras células que pudieran estar relacionadas con la respuesta T_H2 son los mastocitos, los cuales son células prominentes en la piel. Se ha encontrado que poseen receptores Fc γ , por lo que los anticuerpos IgG producidos por la vacuna y sus refuerzos, pueden estar participando en la activación de estas células.^{44,203}

El papel de los mastocitos sobre la respuesta inmune es extenso, se ha reportado que después de la aplicación de antígenos en la piel, estos pueden migrar hacia los nódulos linfáticos e influir en las funciones de los linfocitos T. También, liberan mediadores que pueden inducir la maduración de las células dendríticas hacia un fenotipo efector que favorece la polarización hacia T_H2. Además, se ha observado que en presencia de IL-4 o LPS, estas células producen IL-13, citocina que también ha demostrado promover respuestas T_H2. Con base a lo anterior y a que, como se ha indicado, contribuyen en la magnitud y mantenimiento de respuestas de tipo T_H2, es posible que los mastocitos estén involucrados en la respuesta inducida por la vía i.d, observada en este estudio.^{204–209}

Por otro lado, al evaluar el desarrollo de la lesión provocada por *L. (L.) mexicana*, en el presente trabajo, se encontró que a partir de la semana 3 la inflamación en el cojinete plantar de los ratones incrementó notoriamente, independientemente de la vía de administración y formulación de vacuna evaluada. Esto y el comportamiento de la lesión durante el tiempo, fue similar a lo expuesto por Gamboa-León y colaboradores, quienes utilizaron el mismo modelo de infección.¹⁸⁶

En el experimento, curiosamente se encontró que cuando se administró de forma i.d la vacuna formulada con el adyuvante E6020-SE, la inflamación del cojinete plantar en los ratones fue mayor a la del control salino administrado por la misma vía, esta diferencia fue estadísticamente significativa entre las semanas 3 y 6 post-infección, después se observó el mismo comportamiento hasta la semana 13, aunque durante ese periodo la diferencia entre estos grupos no fue significativa. Esto sugiere que la respuesta celular inducida por la administración i.d de la vacuna, puede estar teniendo un papel importante en el desarrollo de la lesión, debido a que ambiente de citocinas previo a la infección, pudo favorecer la replicación del parásito, ya que está reportado que la presencia de IL-4 promueve la susceptibilidad a la infección en ratones.²¹⁰

Asimismo, los resultados obtenidos en la evaluación del efecto protector, señalan que tanto la vía i.d como i.m inducen un efecto similar, para cualquier formulación de vacuna evaluada. Incluso, ambas rutas fueron capaces de reducir completamente la carga parasitaria en algunos ratones inmunizados con NH36r más MLA. Adicionalmente, se pudo observar que los animales vacunados por vía i.m utilizando el adyuvante MLA, mostraron una reducción en el desarrollo de la lesión, en comparación con la formulación aplicada por vía i.d, aunque esta no alcanzó a ser significativa.

Cabe mencionar que el adyuvante GLA es un análogo del MLA, el cual a pesar de su similitud en estructura y función con el MLA, ha demostrado ser más eficiente para inducir una respuesta T_H1 y ha sido propuesto como una alternativa mejor en conferir protección contra ciertos patógenos. En el estudio realizado por McAtee y colaboradores, ratones BALB/c fueron inmunizados vía i.d con NH36r más GLA-SE e infectados con *L. (L.) mexicana*, si bien, en dicho estudio no se observó una reducción del tamaño de lesión, la vacuna fue capaz de reducir la carga parasitaria. De tal forma que, es posible que la formulación de nuestra vacuna utilizando GLA-SE generara una protección más evidente que la observada al utilizar MLA, no sólo por vía i.d sino aún más por la vía i.m, dado los resultados obtenidos por esta vía, donde se observó una mayor producción de IgG2a.^{180,193}

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio son prometedores, debido a que es el primer trabajo que compara la administración i.d e i.m de NH36r formulada con los adyuvantes E6020-SE, GLA-SE o MLA. Asimismo, es la primera vez que se evalúa la administración i.m de NH36 como proteína recombinante, demostrando que a través de esta vía se favorece la respuesta inmune hacia un perfil T_H1 , siendo esto más evidente cuando el antígeno se formuló con GLA-SE. Por lo que se propone que la vía de administración i.m debe ser considerada para la evaluación de vacunas recombinantes contra *Leishmania*.

IX. CONCLUSIONES

- La administración por vía i.d de NH36r induce una respuesta inmune tipo T_H2 , que al formular el antígeno con GLA-SE dicha respuesta se asoció con la producción de anticuerpos IgG1, mientras que en la formulación con el adyuvante E6020 se asoció con la producción de linfocitos T $CD8^+$ productores de IL-4.
- La aplicación por vía i.m de NH36r más el adyuvante GLA-SE, favorece una respuesta inmune de tipo T_H1 asociada con la producción preferente de anticuerpos IgG2a. La cual es la más apropiada para el control de una infección por *L. (L.) mexicana*.
- La administración de NH36r tanto por vía i.d como i.m, generaron un efecto similar en el desarrollo de la lesión provocada por la infección con *L. (L.) mexicana*.
- La administración de NH36r con MLA, por vía i.d o i.m, produjeron la eliminación de la carga parasitaria en algunos de los ratones infectados con *L. (L.) mexicana*. Por lo tanto, ambas vías podrían ser consideradas para su uso en los procesos de inmunización.

X. PERSPECTIVAS

Con el fin de poder evaluar con mayor precisión las posibles ventajas de las vías de administración propuestas en el presente trabajo, se sugiere realizar estudios que permitan conocer la distribución y persistencia del antígeno en los sitios de inmunización evaluados (piel y músculo), empleando técnicas como microscopía confocal, citometría de flujo y análisis histológicos.

Asimismo, para comprender más a detalle el desarrollo de la respuesta inmune, será importante realizar ensayos sobre la caracterización fenotípica de las células que se encuentren en los sitios de inoculación, nódulos linfáticos y bazo, que pudieran tener un papel importante en la presentación antigénica, como por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans.

También, se sugiere la caracterización fenotípica de LT CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4 en los nódulos linfáticos de las zonas de inmunización, debido a que después de la administración i.d e i.m de una vacuna, es el primer sitio donde se transportan los antígenos para su presentación a los LT. Así también, sería importante evaluar la respuesta inmune (celular y humoral) inducida por la vía de administración de la vacuna y la infección con *L. (L.) mexicana* después de las 13 semanas post-infección.

Por otro lado, para aumentar la significancia de los resultados, se sugiere incrementar el número de animales en los grupos experimentales.

Por último, será importante considerar la evaluación de nuevos antígenos y adyuvantes que resulten viables económicamente y particularmente eficientes para alguna de las vías propuestas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar A. *Leishmania and leishmaniasis*. Vol 3. Nueva York: Springer-Verlag New York; 2013. 83 p.
2. Secretaría de Salud, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Dirección General de Programas Preventivos, Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis. México; 2015.
3. Al-wabel MA, Tonui WK, Cui L, Martin SK, Titus RG. Protection of susceptible BALB/c mice from challenge with *Leishmania major* by nucleoside hydrolase, a soluble exo-antigen of *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(6):1060-1065.
4. Nico D, Claser C, Borja-Cabrera GP, et al. Adaptive immunity against *Leishmania* nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e866.
5. Nico D, Gomes DC, Palatnik-de-Sousa I, Morrot A, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. *Front Immunol*. 2014;5(273):1-12.
6. Aguilar-Be I, da Silva Zardo R, Paraguai de Souza E, et al. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73(2):812-819.
7. Baldwin SL, Bertholet S, Kahn M, et al. Intradermal immunization improves protective efficacy of a novel TB vaccine candidate. *Vaccine*. 2009;27(23):3063-3071.
8. Méndez S, Belkaid Y, Seder RA, Sacks D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2002;20:3702-3708.
9. Mohanan D, Slütter B, Henriksen-Lacey M, et al. Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *J Control Release*. 2010;147(3):342-349.
10. Kennerth M. *Janeway's Immunobiology*. 8a ed. Nueva York: Garland Science; 2011. 888 p.
11. Zuckerman J. The importance of injecting vaccines into muscle. *BMJ*. 2001;321:1237-1238.
12. Romani N, Thurnher M, Idoyaga J, Steinman RM, Flacher V. Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(4):424-430.
13. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. (Internet) 2016; (Consultado Septiembre 2016). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

14. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004349.
15. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
16. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2007;149(3-4):139-146.
17. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev*. 2004;201:206-224.
18. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):248-257.
19. Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*. 2006;133:S87-S112.
20. Bottazzi ME, Dumonteil E, Valenzuela JG, Betancourt-cravioto M, Tapia-conyer R, Hotez PJ. Bridging the innovation gap for neglected tropical diseases in Mexico: capacity building for the development of a new generation of antipoverty vaccines. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011;68(2):138-146.
21. Andrade-Narváez FJ, Vargas-González A, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG. Clinical picture of cutaneous leishmaniases due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):163-167.
22. Cruz-Chan JV, Dumonteil E. Desarrollo de una vacuna contra la leishmaniosis. En: Dumonteil E, ed. Contribución de la biotecnología al desarrollo de la península de Yucatán. Merida; 2012. p. 459-468.
23. Kimblin N, Peters N, Debrabant A, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10125-10130.
24. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;152(1):35-46.
25. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130(2):65-74.
26. Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol*. 2007;29(3):117-126.

27. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 2008;41(1):15-25.
28. Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers M V, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 1991;21(12):3009-3014.
29. Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: An unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol.* 2005;31(3):145-154.
30. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002;24(3):113-118.
31. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001;166(2):1141-1147.
32. Peters NC, Egen JG, Secundino N, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (80-).* 2008;321(5891):970-974.
33. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):581-592.
34. Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep.* 2015;5(April):18302.
35. Afonso L, Borges VM, Cruz H, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* 2008;84(2):389-396.
36. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, et al. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004;173(11):6521-6525.
37. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med.* 2011;208(6):1253-1265.
38. Steinman RM. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med.* 2007;13(10):1155-1159.
39. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med.* 1998;188(8):1547-1552.
40. Duthie MS, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine.* 2012;30(2):134-141.

41. Bajénoff M, Breart B, Huang AYC, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med*. 2006;203(3):619-631.
42. Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2004;199(11):1559-1566.
43. Reiner S, Locksley R. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:151-177.
44. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7a ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2012. 560 p.
45. Sacks DL, Scott PA, Asofsky R, Sher FA. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol*. 1984;132(4):2072-2077.
46. Sutterwala BFS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J Exp Med*. 1998;188(1):217-222.
47. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-615.
48. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2007;29(12):671-678.
49. Ebrahimipour S, Pakzad S, Ajdary S. IgG1 and IgG2a profile of serum antibodies to *Leishmania major* amastigote in BALB/c and C57BL/6 Mice. 2013;12(December):361-367.
50. 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*. 2015;(69):1-7.
51. Uzonna JE, Wei GJ, Yurkowski D, Bretscher P. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: Implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol*. 2001;167(12):6967-6974.
52. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science (80-)*. 1987;236(4804):944-947.
53. Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol*. 1999;91(3):314-320.
54. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the

- immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health*. 1999;4(12):801-811.
55. Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol*. 1991;3(6):587-597.
 56. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Heal*. 2014;2(September):1-6.
 57. Nagill R, Kaur S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(10):1464-1488.
 58. Magill AJ, Ryan ET, Solomon T, Hill DR, eds. Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease. 9a ed. Saunders; 2012. 1190 p.
 59. World Health Organization. *Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.*; 2010.
 60. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des*. 2002;8(4):319-342.
 61. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*. 2004;7(4-5):257-266.
 62. Steven R. Leishmaniasis vaccine development: Animals as models and patients. En: *Vaccine Technology IV*. 2013.
 63. Alvar J, Croft SL, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed SG. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 2:B244-9.
 64. Dumonteil E. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1075-1082.
 65. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian J Med Res*. 2006;(123):423-438.
 66. Rezvan H, Moafi M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Vet Res forum an Int Q J*. 2015;6(1):1-7.
 67. Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res*. 2013;162(3):144-155.
 68. Handman E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2).
 69. Walker PS, Scharon-Kersten T, Rowton ED, et al. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther*. 1998;9(13):1899-1907.
 70. McDowell MA, Rafati S, eds. *Neglected tropical diseases - Middle East and North*

- Africa*. Viena: Springer-Verlag Wien; 2014. 282 p.
71. Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World J Vaccines*. 2014;4(2):50-71.
 72. Grunwald T, Ulbert S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(1):1-10.
 73. Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature*. 2011;473(7348):463-469.
 74. Koff WC, Burton DR, Johnson PR, et al. Accelerating next generation vaccine development for global disease prevention. *Science (80-)*. 2013;340:1064.
 75. Rosado-Vallado ME, Dumonteil E. Vacunas contra enfermedades de la pobreza y su desarrollo en la región. En: Dumonteil E, ed. Contribución de la biotecnología al desarrollo de la península de Yucatán. Merida; 2012. p. 433-449.
 76. Barnard RT. Recombinant vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(5):461-463.
 77. Gillespie PM, Beaumier CM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*. 2016;34(26):2992-2995.
 78. ClinicalTrials.gov. Immune responses after human subject challenge with sand fly bites. (Internet) 2015; (Consultado Noviembre 2016). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01289977>.
 79. Herrera-Najera C, Piña-Aguilar R, Xacur-Garcia F, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E. Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics*. 2009;9(5):1293-1301.
 80. Cruz-Chan JV. Evaluación de la protección conferida por la vacuna DNAPVAX-NH36 en caninos infectados con *Leishmania (L.) mexicana*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2014.
 81. Lukashevich I, Shirwan H, eds. Novel technologies for vaccine development. Springer-Verlag Wien; 2014. 386 p.
 82. Garçon N, Van Mechelen M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(4):471-486.
 83. ClinicalTrials.gov. LEISH-F3 + GLA-SE and the LEISH-F3 + MPL-SE Vaccine. (Internet) 2015; (Consultado Julio 2016). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01751048>.
 84. Fox CB, Friede M, Reed SG, Ireton GC. Synthetic and natural TLR4 agonists as safe and effective vaccine adjuvants. *Subcell Biochem*. 2010;53:303-321.
 85. O'Hagan DT, Fox CB. New generation adjuvants - From empiricism to rational

- design. *Vaccine*. 2015;33(S2):B14-B20.
86. Raman VS, Duthie MS, Fox CB, Matlashewski G, Reed SG. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Front Immunol*. 2012;3(June):144.
 87. Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25(19):3752-3762.
 88. Qureshi N, Takayama K RE. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*. 1982;257(19):11808-11815.
 89. Coler RN, Bertholet S, Moutaftsi M, et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS One*. 2011;6(1):e16333.
 90. Okemoto K, Kawasaki K, Hanada K, Miura M, Nishijima M. A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1 or activation of caspase-1. *J Immunol*. 2006;176(2):1203-1208.
 91. Martin M, Michalek SM, Katz J. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun*. 2003;71(5):2498-2507.
 92. Lambert SL, Yang C-F, Liu Z, et al. Molecular and cellular response profiles induced by the TLR4 agonist-based adjuvant glucopyranosyl lipid A. *PLoS One*. 2012;7(12):e51618.
 93. Coler RN, Baldwin SL, Shaverdian N, et al. A synthetic adjuvant to enhance and expand immune responses to influenza vaccines. *PLoS One*. 2010;5(10):e13677.
 94. Anderson RC, Fox CB, Dutil TS, et al. Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;75(1):123-132.
 95. Coler RN, Duthie MS, Hofmeyer K a, et al. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clin Transl Immunol*. 2015;4(4):e35.
 96. Bertholet S, Goto Y, Carter L, et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*. 2009;27(50):7036-7045.
 97. Ishizaka ST, Hawkins LD. E6020: a synthetic Toll-like receptor 4 agonist as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(5):773-784.
 98. Morefield GL, Hawkins LD, Ishizaka ST, Kissner TL, Ulrich RG. Synthetic Toll-like receptor 4 agonist enhances vaccine efficacy in an experimental model of toxic shock syndrome. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1499-1504.
 99. Baudner BC, Ronconi V, Casini D, et al. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). *Pharm Res*. 2009;26(6):1477-1485.

100. Przetak M, Chow J, Cheng H, Rose J, Hawkins LD, Ishizaka ST. Novel synthetic LPS receptor agonists boost systemic and mucosal antibody responses in mice. *Vaccine*. 2003;21(9-10):961-970.
101. Bottazzi ME, Heffernan MJ, Lee BY. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(9).
102. Seid CA, Jones KM, Pollet J, et al. Cysteine mutagenesis improves the production without abrogating antigenicity of a recombinant protein vaccine candidate for human Chagas disease. *Hum Vaccin Immunother*. October 2016:00-00.
103. Duthie MS, Reed SG. The emergence of defined subunit vaccines for the prevention of leishmaniasis. *Curr Trop Med Reports*. 2014;1(3):154-162.
104. Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:499-529.
105. Russo DM, Burns JM, Carvalho EM, et al. Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *J Immunol*. 1991;147(10):3575-3580.
106. Mazumder S, Maji M, Ali N. Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: high immunogenicity and protection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12).
107. Lohman KL, Langer PJ, McMahon-Pratt D. Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8393-8397.
108. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JPY. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun*. 1995;63(11):4261-4267.
109. McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez JR, et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun*. 1993;61(8):3351-3359.
110. Mougneau E, Altare F, Wakil a E, et al. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science (80-)*. 1995;268(5210):563-566.
111. Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 2001;69(8):4719-4725.
112. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*. 2007;25(46):7962-7971.
113. Soong L, Duboise SM, Kima P, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1995;63(9):3559-3566.

114. Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*. 2001;20(1-2):59-66.
115. Palatnik CB, Borojevic R, Previato JO, Mendonça-Previato L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect Immun*. 1989;57(3):754-763.
116. Nogueira FS, Moreira MAB, Borja-Cabrera GP, et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 2005;23(40):4805-4810.
117. Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, 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):3531-3537.
118. Nascimento E, Fernandes DF, Vieira EP, 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):6581-6587.
119. Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, et al. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*. 2005;23(45):5245-5251.
120. ClinicalTrials.gov. A study of the efficacy and safety of the LEISH-F2 + MPL-SE vaccine for treatment of cutaneous leishmaniasis. (Internet) 2013; (Consultado Julio 2016). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01011309>.
121. Goto Y, Bogatzki L, Bertholet S, Coler R, Reed S. Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. *Vaccine*. 2007;141(4):520-529.
122. Goto Y, Bhatia A, Raman VS, et al. *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. *Vaccine*. 2009;27(21):2884-2890.
123. Cui L, Rajasekariah GR, Martin SK. A nonspecific nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite. *Gene*. 2001;280(1-2):153-162.
124. Mitterbauer R, Karl T, Adam G. *Saccharomyces cerevisiae* URH1 (encoding uridine-cytidine N-ribohydrolase): functional complementation by a nucleoside hydrolase from a protozoan parasite and by a mammalian uridine phosphorylase. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(3):1336-1343.
125. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. (Internet). (Consultado Enero 2015).

Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

126. Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, Paraguai de Souza E, et al. The FML (fucose mannose ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human Kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29(2):153-163.
127. Palatnik-de-Sousa CB, Dutra HS, Borojevic R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose Ligand (FML). *Acta Trop*. 1993;53(1):59-72.
128. Paraguai de Souza E, Bernardo RR, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Vaccination of BALB/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. 2001;19(23-24):3104-3115.
129. Borja-Cabrera GP, Santos FB, Nico D, et al. The Leishmune®'s Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid in immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. *Procedia Vaccinol*. 2012;6:64-73.
130. Nico D, Gomes DC, Alves-Silva MV, et al. Cross-protective immunity to *Leishmania amazonensis* is mediated by CD4+ and CD8+ epitopes of *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains. *Front Immunol*. 2014;5(189):1-10.
131. Azad N, Rojanasakul Y. Vaccine delivery-current trends and future. *Curr Drug Deliv*. 2006;3(2):137-146.
132. Herzog C. Influence of parenteral administration routes and additional factors on vaccine safety and immunogenicity: a review of recent literature. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(3):399-415.
133. Zambrano Villa SA. Antígenos. En: *Inmunología básica y clínica*. México: McGraw-Hill; 2007. p. 12-20.
134. Kabashima K, ed. *Immunology of the skin. Basic and clinical sciences in skin immune responses*. Springer Japan; 2016. 510 p.
135. Teunissen MBM, Haniffa M, Collin M. Insight into the immunobiology of human skin and functional specialization of skin dendritic cell subsets to innovate intradermal vaccination design. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;351:25-76.
136. Lambert PH, Laurent PE. Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*. 2008;26(26):3197-3208.
137. Teunissen M, Kapsenberg M, Bos J. Langerhans cells and related skin dendritic cells. En: *Skin immune system*. 2a ed. CRC Press LLC; 1997.
138. Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci*. 2000;24(SUPPL. 1):29-38.
139. Langerhans P. Über die nerven der menschlichen haut. *Arch Pathol Anat*.

- 1868;44:325-327.
140. Mc Dermott R, Ziylan U, Spehner D, et al. Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. *Mol Biol Cell*. 2002;13(1):317-335.
 141. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17(4):273-283.
 142. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature*. 1977;268(5617):245-246.
 143. Wilson NS, Villadangos JA. Lymphoid organ dendritic cells: Beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(1):91-98.
 144. Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, et al. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(20):7783-7788.
 145. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol*. 2009;10(5):524-530.
 146. Dupasquier M, Stoitzner P, Oudenaren A van, Romani N, Leenen PJM. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123(5):876-879.
 147. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2517-2525.
 148. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):935-947.
 149. Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin + dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 2007;204(13):3119-3131.
 150. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, et al. Identification of a novel population of Langerin + dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204(13):3147-3156.
 151. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, et al. Blood-derived dermal langerin + dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007;204(13):3133-3146.
 152. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(5):488-495.
 153. Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, et al. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J*

- Immunol.* 2009;182(19):774-783.
154. Mclachlan JB, Catron DM, Moon JJ, Jenkins MK. Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity.* 2009;30(2):277-288.
 155. Nagao K, Ginhoux F, Leitner WW, et al. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3312-3317.
 156. Zaba L, Krueger J, Lowes M. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009;129(2):302-308.
 157. Klechevsky E, Liu M, Morita R, et al. Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Hum Immunol.* 2009;70(5):281-288.
 158. Klechevsky E, Morita R, Liu M, et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 2008;29(3):497-510.
 159. Bouvier I, Jusforgues-Saklani H, Lim A, et al. Immunization route dictates cross-priming efficiency and impacts the optimal timing of adjuvant delivery. *Front Immunol.* 2011;2(DEC):1-18.
 160. Liard C, Munier S, Joulin-Giet A, et al. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol.* 2012;132:615-625.
 161. Picot V. Intradermal immunization: An alternative route for vaccine administration. Articles as per sessions meeting report. *Vaccine.* 2008;26(SUPPL. 9):S1-5.
 162. Zehrung D, Jarrahan C, Wales A. Intradermal delivery for vaccine dose sparing: Overview of current issues. *Vaccine.* 2013;31(34):3392-3395.
 163. Babiuk S, Baca-estrada M, Babiuk LA, Ewen C, Foldvari M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *J Control Release.* 2000;66:199-214.
 164. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, eds. Fitzpatrick’s dermatology in general medicine. Vol 1. 8a ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2012.
 165. Ferrante Jr. AW. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes, Obes Metab.* 2013;15 Suppl 3:34-38.
 166. Haramati N, Lorans R, Lutwin M, Kaleya RN. Injection granulomas. Intramuscle or intrafat? *Arch Fam Med.* 1994;3(2):146-148.
 167. Cook IF. Evidence based route of administration of vaccines. *Hum Vaccin.* 2014;4(1):67-73.

168. Abadie V, Bonduelle O, Duffy D, Parizot C, Verrier B, Combadière B. Original encounter with antigen determines antigen-presenting cell imprinting of the quality of the immune response in mice. *PLoS One*. 2009;4(12):e8159.
169. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol*. 2012;188(4):1751-1760.
170. Liang F, Sandgren K, Fausther-Bovendo H, et al. Infiltration of dendritic cells and antigen uptake in the muscle after injection of HIV-1 Env gp120 in adjuvant. *Retrovirology*. 2012;9(Suppl 2):O16.
171. Henriksen-Lacey M, Bramwell VW, Christensen D, Agger E-M, Andersen P, Perrie Y. Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. *J Control Release*. 2010;142(2):180-186.
172. Laurent PE, Bonnet S, Alchas P, et al. Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine*. 2007;25(52):8833-8842.
173. Wolff J a, Dowty ME, Jiao S, et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci*. 1992;103:1249-1259.
174. Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol*. 2005;26(7):373-380.
175. Garlepp MJ, Chen W, Tabarias H, Baines M, Brooks A, McCluskey J. Antigen processing and presentation by a murine myoblast cell line. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(3):614-9.
176. Briggs DJ, Banzhoff A, Nicolay U, et al. Antibody response of patients after postexposure rabies vaccination with small intradermal doses of purified chick embryo cell vaccine or purified Vero cell rabies vaccine. *Bull World Health Organ*. 2000;78(5):693-698.
177. Khawplod P, Wilde H, Tepsumethanon S, et al. Prospective immunogenicity study of multiple intradermal injections of rabies vaccine in an effort to obtain an early immune response without the use of immunoglobulin. *Clin Infect Dis*. 2002;35(12):1562-1565.
178. Holland D, Booy R, De Looze F, et al. Intradermal influenza vaccine administered using a new microinjection system produces superior immunogenicity in elderly adults: a randomized controlled trial. *J Infect Dis*. 2008;198(5):650-658.
179. Meyer J, Harris S a, Satti I, et al. Comparing the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine MVA85A administered by intramuscular and intradermal delivery. *Vaccine*. 2013;31(7):1026-1033.
180. McAtee CP, Seid C a., Hammond M, et al. Expression, purification,

- immunogenicity and protective efficacy of a recombinant nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*, a vaccine candidate for preventing cutaneous leishmaniasis. *Protein Expr Purif.* 2017;130:129-136.
181. Fox CB, Moutaftsi M, Vergara J, et al. TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses. *Vaccine.* 2013;31(49):5848-5855.
 182. Fox CB, Baldwin SL, Vedvick TS, Angov E, Reed SG. Effects on immunogenicity by formulations of emulsion-based adjuvants for malaria vaccines. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(10):1633-1640.
 183. Baldwin SL, Bertholet S, Reese V a, Ching LK, Reed SG, Coler RN. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. *J Immunol.* 2012;188:2189-2197.
 184. Skeiky YAW, Coler RN, Brannon M, et al. Protective efficacy of a tandemly linked , multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL® adjuvant. 2002;20:3292-3303.
 185. Ashok D, Acha-Orbea H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.* 2014;30(10):499-507.
 186. Gamboa-León MR, Aranda-González I, Mut-Martín M, García-Miss MR, Dumonteil E. In vivo and in vitro control of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. *Scand J Immunol.* 2007;66(5):508-514.
 187. Teixeira MCA, de Sá Oliveira GG, Santos POM, et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(2):182-189.
 188. Cruz-Chan JV, Aguilar-Cetina ADC, Villanueva-Lizama LE, et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasit Vectors.* 2014;7:361.
 189. Mottram J. *Protocols for Handling and Working with Leishmania Species.*; 2008.
 190. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3892-3904.
 191. Boyle JS, Silva A, Brady JL, Lew a M. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14626-14631.
 192. Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol.* 1996;70(9):6119-6125.
 193. Giese M. Introduction to molecular vaccinology. Springer International Publishing; 2016. 373 p.

194. Boyd JH, Divangahi M, Yahiaoui L, Gvozdic D, Qureshi S, Petrof BJ. Toll-like receptors differentially regulate CC and CXC chemokines in skeletal muscle via NF- κ B and calcineurin. *Infect Immun*. 2006;74(12):6829-6838.
195. Goebels N, Michaelis D, Wekerle H, Hohlfeld R. Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1992;149(2):661-667.
196. Hohlfeld R, Engel AG. The immunobiology of muscle. *Immunol Today*. 1994;15(6):269-274.
197. Curnow J, Corlett L, Willcox N, Vincent A. Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *J Neuroimmunol*. 2001;115(1-2):127-134.
198. Marino M, Scuderi F, Provenzano C, Bartoccioni E, M Marino, F Scuderi CP and EB. Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther*. 2011;18(2):109-116.
199. Freund J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*. 1956;(10):130-148.
200. Le Gros G, Erard F. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8⁺ T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(3):453-457.
201. Erard F, Wild MT, Garcia-Sanz JA, Le Gros G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4⁻ cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science*. 1993;260(5115):1802-1805.
202. Romani N, Flacher V, Tripp CH, Sparber S, Ebner S, Stoitzner P. Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;351:113-138.
203. Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Fc γ receptors on mast cells: Activatory and inhibitory regulation of mediator release. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133(3):305-315.
204. Wang HW, Tedla N, Lloyd AR, Wakefield D, McNeil PH. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest*. 1998;102(8):1617-1626.
205. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-142.
206. Aoki I, Itoh S, Yokota S, et al. Contribution of mast cells to the T helper 2 response induced by simultaneous subcutaneous and oral immunization. *Immunology*. 1999;98(4):519-524.
207. McLeod JJ a., Baker B, Ryan JJ. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine*. 2015;75(1):57-61.
208. Gessner A, Mohrs K, Mohrs M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are

- sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol.* 2005;174(2):1063-1072.
209. Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(4):899-906.
210. Bogdan C, Moll H, Solbach W, Rölinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin-4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol.* 1990;20(5):1131-1135.