



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

Seguimiento de la respuesta inmune generada tras la administración de varias proteínas de *Leishmania infantum* en ratones BALB/c. Análisis de la diversidad generada en el repertorio CDR3 y su relación con la inmunización y el desarrollo de la patología inducida por *Leishmania*.

Memoria presentada por la Licenciada

Lina Jimena Cortés Salinas

Para optar al grado de Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis:

Dr. Carlos Alonso Bedate

Madrid, Octubre de 2011

“Con el apoyo del Programa Alβan, Programa de Becas de Alto Nivel de la Unión Europea para América Latina, beca No. E07D403078CO”

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Carlos Alonso Bedate por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por la confianza que depositó en mí y el apoyo constante que me brindó a lo largo de este tiempo, principalmente en los momentos más difíciles. Carlos, muchas gracias, sin tu apoyo no hubiera sido posible terminar este proyecto.

También quiero agradecer a una persona que me guió durante toda la realización de este trabajo, que con su dedicación y desinteresada colaboración ha hecho posible que esta tesis llegara al final; Sancho Panza. He aprendido mucho de ti.

Al Dr. Pedro Bonay, muchas gracias por abrir las puertas de su laboratorio y por hacerme sentir parte del mismo.

Al Dr. Alberto Martínez Serrano, quiero agradecerle el gran apoyo que me brindó, sobre todo en un momento muy delicado para mí. Eres un hombre de pocas palabras pero de grandes actos.

Yaguito, dicen que los amigos son la familia que uno escoge; eso has sido para mí... como un hermano, la persona que siempre me ha escuchado, apoyado y aconsejado en todo momento. Un gracias se queda corto para expresarte lo inmensamente afortunada que me siento por tener como amigo a una persona de la que aprendo cada día algo más. Creo que nunca nos despediremos... siempre será un "nos vemos chino".

A los que fueron mis compañeros del 302 y que ahora son mis amigos. Nadia (Mi Capullito de Alhelí), Gus y Javi. La amistad supera las circunstancias. Pero en nuestro caso; tuvimos que superar las circunstancias y forjamos una gran amistad. Gracias "nenes" por todos los instantes vividos a lo largo de estos años, por dejarme compartir con ustedes y sus familias muy buenos momentos. Capullito de Alhelí y maesshtro Jorge Fernando, ojalá podamos seguir conociendo más lugares y teniendo esos buenos veranos. Gus, eres el mejor anfitrión de España para el mundo, un amigo incomparable, un ser muy especial. Javi, tu ayuda en aquel momento fue vital para mí, gracias.

Maika de Jesús y Marisa de los Ángeles, gracias por brindarme su amistad, su apoyo incondicional, por darme la oportunidad de conocerlas y aprender de cada una algo nuevo. Maika tu desbordante alegría y forma de ver el mundo. Marisa tu serenidad para afrontar los retos y no perder la calma. Gracias por traerme de vuelta al mundo cuando estaba abstraída de él. Chicas las llevo en mi corazón.

A Laura del Socorro, Laura de los cálculos, la "Chinita" y Laura "Ranger", muchas gracias por todos los momentos compartidos, por los días buenos y los no tan buenos. Por aquellas largas jornadas de trabajo que parecían no terminar pero en las que siempre tuvimos algo para reírnos, relajarnos y seguir hasta el final. Por las memorables clases de lengua "Colombo-ibérica" e "introducción a la música del verano y fiestas de pueblo", siempre las recordaré.

Nuria, muchas gracias por ser un apoyo constante durante todo este tiempo, sobre todo en la etapa final. Pareces casi distante pero eres oportuna y muy dispuesta a ayudar sin esperar nada a

cambio, tus consejos y tus actos han ayudado para que este sueño sea una realidad.

A todos los miembros del laboratorio 305; a aquellos que se han ido y a los que aún están. Bea, Emma, Tamara, María José, Tania, Martha, Elise, Elisa, Ignacio, Claudia. Mil gracias por adoptarme, compartir conmigo cada día de los que estuve allí y hacerme sentir que siempre he sido parte de ese laboratorio.

También quiero agradecer a todo el laboratorio 226; María Chorro, Carmen Punzón, Maika, Marisa, Carlos, Cristóbal, Carmencita, Josella, Inés, Julien, Néstor, en fin todos por tener un saludo, un gesto amable, por invitarme a compartir un café, la comida, las cañas del viernes y hacerme sentir muy bien.

Chicas del 126, Gemma, Cristina, Raquel, Ana, Paloma, muchas gracias por tener una sonrisa cordial y estar dispuestas a ayudarme en los momentos que estuve allí y necesité de su colaboración.

Agradezco al personal de los diferentes servicios del CBMSO su colaboración para la realización de este trabajo. Gracias al personal del animalario, a Alfonso en el P2, compras, almacén, cocinas, fotografía, biblioteca a todos. Especialmente quiero agradecer al personal del servicio de microscopía óptica y confocal por la paciencia y gran dedicación que tienen para realizar su trabajo. En administración quiero también agradecer a Reyes Llaguno por su amabilidad y prontitud para resolver cada trámite. Todos ellos han contribuido a la realización de este trabajo.

Al Prof. Manuel Elkin Patarroyo, “Jefe”, su ejemplo de vida al servicio de la ciencia ha sido una inspiración para mí. Gracias por haber permitido que me formara en su grupo.

A mis amigos en Colombia que siempre me han apoyado. Maggy, tu amistad ha sido muy importante para mí. Dany, gracias... me ayudaste a volar. Diana, Angélica, Andrea, Yolis, Dianis, “Mona”, Hernando, Flaquito, Jaiver, a todos gracias por acompañarme desde allí y por la amistad que conservamos a pesar de la distancia.

Yoryi, conocerte y compartir contigo este tiempo ha sido una de las mejores experiencias que me ha regalado la vida. Quiero darte las gracias por ser mi amigo, mi constante apoyo, por hacerme reír y prestarme tu hombro para llorar, por devolverme la confianza cuando ya la había perdido, por dedicarme esos largos momentos de intenso trabajo, por la infinita paciencia que tienes cuando estoy difícil, por ser quien eres y por compartir tu vida conmigo. Finalmente... ¡lo logramos!

De forma muy especial quiero agradecer a mi familia, a todos y cada uno de ellos por brindarme apoyo incondicional cuando la idea de viajar a realizar este proyecto se cruzó por mi cabeza. Gracias, por esas grandes sonrisas y bienvenidas cuando llegaba a casa y también por las lágrimas cuando tenía que partir. Por estar conmigo y compartir, en la distancia, los cumpleaños, las navidades, las visitas familiares, mis frustraciones y logros, por estar ahí en cada paso que he dado. Pero sobre todo gracias por ser mi familia, esa que está orgullosa de mí. A ti mamá, gracias porque lo que soy ha sido gracias a tu ejemplo, constancia y esfuerzo, esta tesis es tuya.

A dos mujeres excepcionales: Rafis y Má

Indice	
Índice.....	9
Abstract	13
Abreviaturas usadas.....	15
1. Introducción.....	19
1.1. Generalidades.....	19
1.1.1. Reseña histórica.....	19
1.1.2. Morfología del parásito.....	19
1.1.3. Clasificación taxonómica.....	20
1.1.4. Ciclo de vida.....	21
1.2. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las leishmaniasis.....	21
1.2.1. Epidemiología.....	21
1.2.2. Manifestaciones clínicas.....	22
1.2.3. Las leishmaniasis en España.....	24
1.3. Relación Parásito-Hospedero.....	24
1.3.1. Respuesta inmune frente a <i>Leishmania</i>	25
<i>Respuesta innata frente al parásito.....</i>	25
<i>Respuesta Adquirida.....</i>	26
<i>El Receptor de las Células T.....</i>	29
1.4. Modelos de Infección experimental.....	30
1.4.1. Modelos de Leishmaniasis cutánea en ratón.....	30
1.5. Diagnóstico, control y tratamiento de la leishmaniasis....	33
1.5.1. Vacunas basadas en la administración de parásitos vivos, atenuados o muertos.....	34
1.5.2. Vacunas basadas en moléculas definidas.....	35
1.5.3. Vacunas de ADN.....	37

1.6.	Los oligodeoxinucleótidos con motivos CpG como adyuvantes.....	38
1.7.	La proteína Q de <i>Leishmania</i>	39
1.8.	Perspectivas en el desarrollo de vacunas frente a leishmaniasis.....	40
2.	Objetivos.....	45
3.	Materiales y Métodos.....	49
3.1.	Reactivos y soluciones	49
3.2.	Material biológico.....	49
3.2.1.	Bacterias.....	49
3.2.2.	Parásitos.....	49
3.2.3.	Líneas celulares.....	49
3.2.4.	Animales de experimentación.....	49
3.3.	Oligodeoxinucleótidos con motivos CpG.....	49
3.4.	Medios y condiciones de cultivo.....	50
3.4.1.	Medio LB (Luria-Bertani).....	50
3.4.2.	Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute).....	50
3.4.3.	Medio Schneider's.....	50
3.4.4.	Medio "RPMI completo".....	50
3.4.5.	Medio DMEM Completo.....	50
3.5.	Purificación de ADN plasmídico.....	50
3.5.1.	Preparación de células competentes y transformación.....	50
3.6.	Purificación de proteínas recombinantes.....	51
3.6.1.	Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a cadenas de histidinas (6x His-tagged proteins, vector pQE) mediante cromatografía de afinidad	51
	<i>Purificación en condiciones desnaturalizantes</i>	51
	<i>Purificación en condiciones nativas</i>	52
3.7.	Electroforesis y cuantificación de proteínas.....	52

3.8.	Transfección <i>in vitro</i> de células COS-7.....	52
3.9.	Inmunofluorescencia.....	52
3.10.	Pautas de inmunización y obtención de sueros.....	53
3.11.	Infecciones experimentales.....	53
	3.11.1. Infección en la almohadilla plantar de ratones BALB/c.....	54
3.12.	Medida de las lesiones cutáneas en los ratones infectados con <i>L. major</i>	54
3.13.	Estimación de la carga parasitaria.....	54
3.14.	Obtención de cultivos primarios de bazo y ganglio linfáticos.....	54
	3.14.1. Condiciones de estimulación para la determinación de citoquinas.....	54
3.15.	Ensayos de ELISA.....	55
	3.15.1. Ensayo de ELISA convencional.....	55
	3.15.2. Ensayo de ELISA para la determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos.....	55
3.16.	Extracción de ARN.....	55
3.17.	Síntesis de ADNc.....	56
3.18.	Cuantificación de la expresión de los genes para citoquinas por PCR en tiempo real.....	56
3.19.	Análisis del repertorio TCRV β por medio de la determinación del tamaño del CDR3	56
3.20.	Análisis estadístico.....	60
4.	Resultados.....	62
4.1.	Obtención de la Proteína Q y los antígenos LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0 como antígenos recombinantes.....	62
4.2.	Expresión de la Proteína Q como vacuna de ADN.....	62
4.3.	Evaluación de la respuesta inmune generada tras la inoculación de la Proteína Q en el modelo BALB/c.....	63

4.3.1.	Respuesta inmune humoral.....	63
	<i>Respuesta de anticuerpos tipo IgM e IgG frente a las diferentes formulaciones de la Proteína Q.....</i>	<i>63</i>
	<i>Modulación de la respuesta IgG1 e IgG2a.....</i>	<i>67</i>
	<i>Respuesta inmune humoral generada frente a las proteínas LiH2A, Lip2b, LiP2a y Lip0</i>	<i>68</i>
4.3.2.	Respuesta inmune celular generada frente a la Proteína Q..	68
	<i>Las diferentes formulaciones de la Proteína Q inducen la síntesis de citoquinas Tipo Th1 y Th2.....</i>	<i>69</i>
	<i>Respuesta inmune celular generada frente a las proteínas LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0</i>	<i>73</i>
4.4.	Análisis de la diversidad del repertorio CDR3 en ratones inmunizados con la Proteína Q y pcDNA3Q	75
4.5.	Análisis del desarrollo de la enfermedad en el modelo susceptible BALB/c frente al reto con <i>L. major</i>.....	78
4.5.1.	Análisis de la evolución de la infección causada por <i>Leishmania major</i>.....	78
4.6.	Análisis de la respuesta inmune generada en los ratones vacunados tras la infección experimental con <i>L. major</i>....	81
4.6.1.	Respuesta inmune humoral frente a SLA y Proteína Q.....	81
4.6.2.	Respuesta celular.....	81
4.7.	Análisis de la diversidad del repertorio CDR3 en ratones vacunados que retrasan la inflamación.....	85
5.	Discusión.....	91
6.	Conclusiones.....	103
7.	Bibliografía.....	107
8.	Anexo 1.....	121
9.	Anexo 2.....	137

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is a common tropical disease and at present it is considered a worldwide health problem. As deduced from a large number of publications, the understanding of the components involved in susceptibility or disease control has substantially increased. They have provided, moreover, clues to design effective vaccines against this fastidious pathogen. Until now a large number of vaccines have been tested. Although some of them can generate a robust response to control the disease in animal models, only one is in phase I trial in humans. Thus, further research is needed to have a deeper understanding of the infection and the disease. The use of vaccine subunits composed by characterized antigens could be an effective solution to control Leishmaniasis. Actually there is no vaccine developed for humans. Therefore intense studies in heterologous system are crucial to understand the mechanisms of the immune response against the pathogen.

In the present work the protective and immunogenic capacity of the Q Protein was evaluated in a *L. major*-susceptible BALB/c mouse model. The Protein Q is a molecule formed by the genetic fusion of fragments from the acidic ribosomal proteins LiP2a, LiP2b and LiP0 and the histone H2A (Soto, Requena *et al.* 1998). Due to the importance of the formulations for the effectiveness of any vaccine or pharmacological agent, five different presentations of Q were used to inoculate the animals. The cellular response was evaluated measuring the expression levels of cytokine involved in Th1 or Th2 responses. Moreover, the production of different antibodies types (IgM, IgG, IgG1 and IgG2a) was used to determine the humoral response against the Q protein and its components, individually. All tested formulations induce a mixed Th1/Th2 response characterized by INF- γ , IL-10 e IL-13 expression combined with production of IgG1 and IgG2 antibodies. At the same time, we found that the immunogenic potential of the chimeric Q Protein was mainly due, in our assays, to the LiP2a and LiP2b determinants.

Another relevant approach of this work was the analysis of the diversity of the TCR repertoire triggered after the immunization with Q as a recombinant protein and as a DNA vaccine. Here, we analyzed the TCRV β repertoire by complementarity-determining region 3 (CDR3) length spectratyping. After the stimulation with the Q protein, the mice inoculated with the pcDNA3Q (DNA vaccine) showed significant differences in the TCR repertoire relative to the mice inoculated with the Q recombinant protein. T V β 9, V β 12, V β 16 and V β 18 were the populations that mostly varied in this TCR-analysis comparison.

After the evaluation of the humoral and cellular responses against the Q, we challenge the mice inoculated with the five different formulations using *L. major* parasites as the infection agent. Only two out of the five formulations tested generated a delay in the appearance of the footpad inflammation. Interestingly, this delay was only observed in 50% of the infected animals. The infected animals generated mixed Th1/Th2 responses against SLA. However when the spleen cells of these animals were stimulated with SLA they produced INF- γ and iNOS.

The TCR repertoire was also evaluated in the challenged animals. Similarities in the spectratype profiles were found in the mice that showed a delay in the development of footpad inflammation. Splenocytes of the infected animals stimulated with the Q protein presented changes in the same families (V β 9, V β 12, V β 16 and V β 18) that the animals that had been immunized but not challenged. Animals in which a delay in footpad inflammation was detected showed significant differences in the T V β 2 and V β 12 families relative to the animals in which such delay was not observed, suggesting that these populations may be involved in the protective response against *L. major*.

Abreviaturas usadas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BCG: bacilo de Calmette-Guerin

BSA: albúmina de suero bovino

CD: del inglés *cluster of differentiation* (marcadores de diferenciación)

CP: proteasa de cisteínas

CPA: célula presentadora de antígeno

CTL: linfocitos T citotóxicos

CTL4: del inglés *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

DCs: del inglés dendritic cells (células dendríticas)

DMSO: dimetil-sulfóxido

D. O.: densidad óptica

ELISA: del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FCS: suero fetal bovino

FITC: isotiocianato de fluoresceína

Gp46: glicoproteína de 46 kDa

Gp63: glicoproteína de 63 kDa

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

LACK: homólogo del receptor para la proteína kinasa C activada en *Leishmania*

LC: leishmaniasis cutánea

LCD: leishmaniasis cutánea difusa

LMC: leishmaniasis Mucocutánea

LPG: lipofosfoglicano

LV: leishmaniasis visceral

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NK: del inglés *natural killers* (células asesinas)

NO: óxido nítrico

ODN: oligodeoxirribonucleótido

OMS/WHO: organización mundial de la salud “World Health Organization”

OPD: 1,2-fenildiamina

PAMPS: del inglés *pathogen associated molecular patterns*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride

PRRs: del inglés *pattern recognition receptor*

s.c: subcutánea

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SLA: antígeno soluble de *Leishmania*

TCR: receptor de antígeno de células T

TGF: factor de crecimiento transformante

TLR: del inglés *toll-like receptor* (receptor de tipo Toll)

TNF: factor de necrosis tumoral

Th: del inglés *T helper* (linfocito T cooperador)

VIH: virus de inmunodeficiencia humano

VP: vacuola parasitófora

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Generalidades

La leishmaniasis consiste en un espectro de enfermedades que afectan a vertebrados superiores, entre ellos el hombre; los cuadros clínicos son muy diversos y dependen tanto del estado inmunológico del hospedero como de la especie del parásito involucrada. La infección puede ser clasificada dentro de tres síndromes clínicos conocidos como *Leishmaniasis cutánea*, *Leishmaniasis mucocutánea* y *Leishmaniasis visceral*.

La infección y la enfermedad es causada por aproximadamente 21 especies del parásito del género *Leishmania*. Habitualmente es transmitida por 30 especies de mosquitos del género *Phlebotomus*, en el Viejo Mundo, ó del género *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo.

1.1.1. Reseña histórica.

Una de las primeras y más importantes descripciones clínicas de la enfermedad se hizo en 1756 por Alexander Russell tras examinar a un paciente de origen turco con una lesión en su piel a la que denominó “Botón de Aleppo”. Posteriormente, en 1885 Cunningham describió la presencia de formas ovaladas en biopsias de pacientes con “ulcera oriental” procedentes de la India. En 1901, William Leishman describe la presencia de numerosos cuerpos ovals intracelulares de 2 a 3 micras de diámetro en el frotis de bazo de un soldado irlandés que murió por una “fiebre”. Por la misma fecha, Charles Donovan describió datos similares al analizar los frotis de los bazos de pacientes indios que supuestamente habían muerto por malaria. Ya en 1903, Roland Ross relaciona estos organismos con el Kala-azar (del sánscrito: Kala “negra, impura” y azar “fiebre”) y decide llamar a este nuevo patógeno como *Leishmania donovani* (Awasthi, Mathur et al. 2004).

Aunque la caracterización definitiva del parásito no se produjo hasta comienzos del siglo XX, existen representaciones de lesiones en la piel y deformidades faciales en cerámicas pre-incas de Ecuador y Perú que datan del siglo I DC, lo que prueba que las formas cutáneas y mucocutáneas ya existían en el nuevo mundo. (WHO/OMS, 2001).

1.1.2. Morfología del parásito.

Los parásitos tienen un ciclo de vida digenético y poseen dos formas diferentes, el amastigote que no posee flagelo, con un tamaño comprendido entre 3 – 5 µm de diámetro, se encuentra en las células del sistema mononuclear fagocítico, que incluye macrófagos, células de Langerhans y monocitos e incluso otras células del linaje linfático del hospedero mamífero (Solbach and Laskay 2000). El promastigote con una forma alargada y flagelo con un tamaño de 15 – 24 µm existe y se multiplica de forma extracelular en el tracto digestivo de la hembra del vector y es transmitido durante la picadura al hospedero (Sharma and Singh 2009).

Tanto el amastigote como el promastigote son células con un alto nivel de organización. La membrana plasmática es una bicapa lipídica que se encuentra tapizada por un glucocálix formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI) (Englund 1993), relacionado con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocálix son una glicoproteína de 63 kDa (Gp63), la PSA-2 de 46 kDa

ó (Gp 46) y el lipofosfoglicano (LPG). La glicoproteína de 63 kDa (Gp63) es una metaloproteinasas polimórfica conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Esta proteína está presente en las dos formas del parásito, aunque en los amastigotes existe un número menor de copias y se localiza en el interior de los lisosomas (Ilg, Harbecke et al. 1993). La PSA-2 se encuentra en todas las especies de *Leishmania* excepto en el subgénero *Viannia*. La familia de proteínas PSA-2 fue identificada inicialmente en promastigotes pero posteriormente un miembro de esta familia se encontró en amastigotes (Handman, Osborn et al. 1995). Por último, el LPG es el componente más abundante del promastigote y desempeña un papel importante para la supervivencia y transmisión. Su número de copias es menor en amastigotes -6×10^4 copias/célula- que en promastigotes -5×10^6 copias/célula- (Moody, Handman et al. 1993). Tanto el amastigote como el promastigote poseen kinetoplasto; una red de microtúbulos subpeliculares que forman un citoesqueleto rígido y el flagelo. El cuerpo basal del flagelo está situado junto al kinetoplasto en una invaginación de la membrana denominada bolsillo flagelar. El flagelo, junto con la red microtubular constituyen el motor celular, mientras que el bolsillo flagelar y las vesículas que lo rodean se encargan del proceso de endocitosis y exocitosis (Hommel 1999).

En la actualidad el proceso reproductivo en *Leishmania* todavía no se encuentra totalmente definido (Rougeron, De Meeus et al. 2010). Lo más común para éste género y otros Trypanosomátidos es que la reproducción asexual sea la principal vía de replicación de estos organismos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la aparición de procesos sexuales de multiplicación (Akopyants, Kimblin et al. 2009). Estos procesos ocurrirían durante el estadio de amastigote en el intestino del vector, donde los parásitos harían un intercambio genético por medio del “apareamiento” (Akopyants, Kimblin et al. 2009).

1.1.3. Clasificación taxonómica.

Desde la descripción original de estos parásitos y la posterior creación del género *Leishmania* por Ross en 1903, el número de especies reconocidas ha aumentado continuamente. La técnica de referencia para la clasificación del género y la identificación a nivel específico e intraespecífico de dichos parásitos es la electroforesis de isoenzimas (Grimaldi and Tesh 1993). Así, los parásitos de este género cuyo origen en la evolución eucariota es muy temprano poseen la clasificación taxonómica mostrada en la tabla 1.1.

Reino	PROTISTA Haeckel, 1866
Subreino	PROTOZOA Goldfuss, 1817
Filo	SARCOMASTIGOPHORA Honigberg- Balamuth, 1963
Subfilo	MASTIGOPHORA Deising, 1866
Clase	ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
Orden	KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963 modificado por Vickerman, 1976
Suborden	TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
Familia	TRYPANOSOMATIDAE Doeflein, 1901
Género	<i>Leishmania</i> Ross, 1903
Subgénero	<i>Leishmania</i> Saf'janova, 1982

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *Leishmania*

1.1.4. Ciclo de vida.

Como se mencionó antes *Leishmania* posee un ciclo de vida digenético o heteroxeno, es decir, realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedero invertebrado (numerosas especies del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) en forma flagelar o promastigote y otra parte en el hospedero vertebrado (gran variedad de géneros) principalmente en los macrófagos, en forma aflagelar o amastigote. Cuando el flebótomo parasitado ingiere sangre de un vertebrado, inocula, acompañado de su saliva, los promastigotes existentes en la probóscide. Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedero vertebrado, se produce una fagocitosis por parte del macrófago, que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre ellos el óxido nítrico (NO) y la liberación de hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitófora. *Leishmania* logra evadir estas reacciones inespecíficas del macrófago para sobrevivir, transformarse en amastigote y multiplicarse en su interior (Rittig and Bogdan 2000).

La progresión de la enfermedad dependerá de la virulencia del protozoo y de la eficacia de la respuesta inmune del hospedador. La multiplicación y desarrollo de los amastigotes finaliza, probablemente, con la lisis del macrófago. Los parásitos libres invaden otros macrófagos locales repitiéndose el proceso multiplicativo, o bien se diseminan a través del torrente sanguíneo y linfático, logrando establecerse en regiones ricas en células macrofágicas (médula ósea, hígado y bazo principalmente). Las células parasitadas circulantes también pueden ser ingurgitadas por otros flebótomos, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes, para transformarse posteriormente en promastigotes. Pasados varios días alcanzan la capacidad infectiva (metaciclologénesis) y migran desde el intestino a la probóscide del flebótomo, pudiendo ser inoculados a otro hospedero vertebrado, cerrando así el ciclo (Figura 1.1).

1.2. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las leishmaniasis

1.2.1. Epidemiología

Las leishmaniasis presentan una amplia distribución mundial y son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países. Se estima que hay un total de 350 millones de personas en riesgo, alcanzando una prevalencia de 12 a 14 millones de afectados y una incidencia anual de 2 millones de casos por año, de los cuales 1,5 millones son por Leishmaniasis Cutánea (LC) (Sharma and Singh 2009).

La OMS considera a esta enfermedad como una de las prioritarias en su Programa Especial de Investigación y Entrenamiento sobre Enfermedades Tropicales, de igual forma la clasificó en la categoría I de las enfermedades infecciosas, que son las que se encuentran en situación emergente incontrolada (WHO Report 2008).

A pesar de que en Europa la enfermedad en humanos se manifestaba en esporádicas ocasiones, en las últimas décadas ha cobrado gran importancia ya que se diagnostica en la población adulta inmuno-deprimida (Sundar and Rai 2002), debido por una parte, al comportamiento oportunista de la infección y su prevalencia en pacientes con el virus del VIH (Desjeux and Alvar 2003) y por otra al incremento de los viajes a áreas endémicas donde los pacientes adquieren la infección.

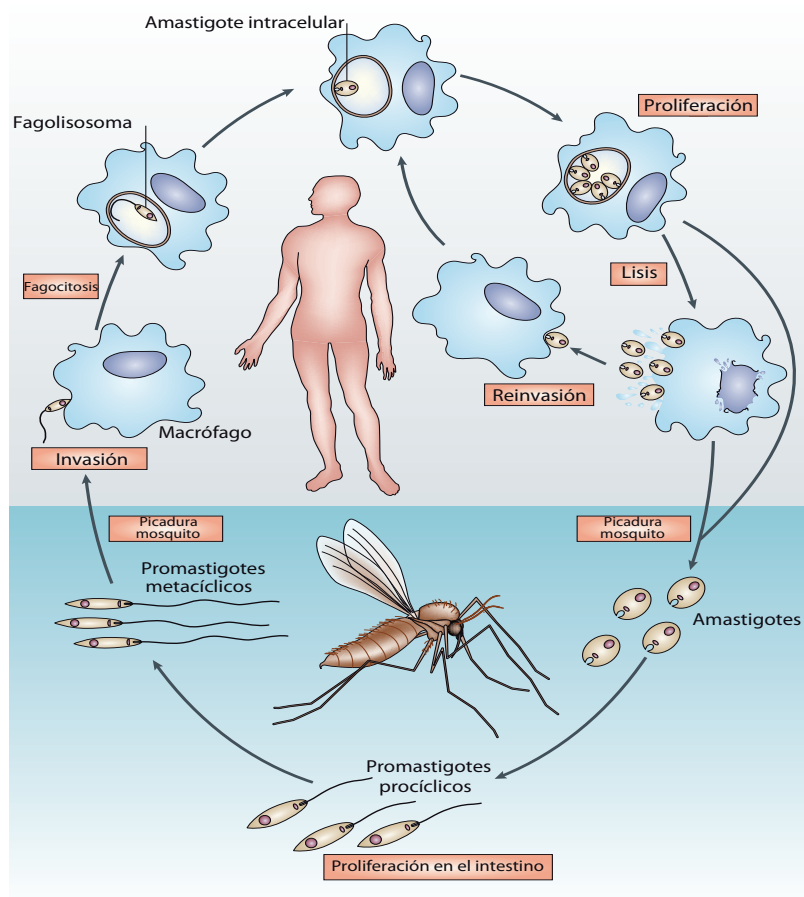


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Leishmania*

1.2.2. Manifestaciones clínicas:

Las leishmaniasis se manifiestan principalmente en tres formas clínicas:

Leishmaniasis Visceral (LV). También conocida como *Kala-azar* es la forma más severa de la enfermedad. Producida por *L. infantum* y *L. donovani* (*L. chagasi* en América). El periodo de incubación suele ser de meses ó incluso años, tiempo en que el protozoo alcanza los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea y tejido linfático. La expresión clínica se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, leucopenia, anemia y pérdida de peso (Murray, Berman et al. 2005). La hipergammaglobulinemia, se debe a la activación policlonal de los linfocitos B causando un aumento en los niveles de Inmunoglobulina M (IgM) e IgG lo que puede conducir a la formación de complejos circulantes que al depositarse en los riñones causan glomerulonefritis (Kharazmi, Rezai et al. 1982). En fases más avanzadas en ausencia de tratamiento puede producir caquexia, sangrado, infecciones secundarias y muerte.

Leishmaniasis Cutánea (LC). Es causada por parásitos del complejo *Leishmania tropica*, incluido *L. major*. Es la forma más común de la enfermedad, conocida también como “Botón de Oriente” o Úlcera de los chicleros. La forma más común de la enfermedad es la presencia de una lesión única o múltiple, según el número de picadas, con una depresión en la parte central y el borde indurado. La infección suele curar espontáneamente a partir del cuarto o sexto mes de infección dejando cic-

trices en la piel y en algunos casos serias desfiguraciones. En individuos con una única infección se observa una larga protección a la reinfección (Kemp 1997). Una manifestación dérmica de la LC es la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), frecuente en zonas selváticas y América Central. Se caracteriza por la propagación metastásica de la infección en forma de pápulas o granulomas extendidos por la piel en zonas expuestas a la luz, sin causar úlceras.

Leishmaniasis Mucocutánea (LMC). Es una secuela de la leishmaniasis cutánea del nuevo mundo, conocida también como espundia, es causada por parásitos del subgénero *Viannia*. Aproximadamente el 15% de los casos termina de esta manera en un plazo de dos a diez años (Alvar 2001). La LMC inicia con eritema, y ulceraciones en las fosas nasales causando perforación en el tabique nasal, afectando también laringe, faringe y lesiones inflamatorias destructivas que generalmente desfiguran la cara del paciente.

Coinfección Leishmaniasis/VIH. Se considera la cuarta manifestación clínica de leishmaniasis. La coinfección con el virus del VIH aumenta el riesgo de sufrir LV de 100 a 2320 veces más en zonas endémicas (Lartey, Adusei et al. 2006). La leishmaniasis promueve la progresión clínica del VIH y ésta a su vez, favorece el crecimiento del parásito, las dos enfermedades actúan de forma sinérgica negativa sobre la inmunidad celular (Alvar, Aparicio et al. 2008). Las descripciones acerca de la coinfección de VIH-LC destacan lesiones atípicas e inusuales pero bastante graves, debido a que el virus promueve una respuesta Th2 (Clerici and Shearer 1993), al bajo recuento de células CD4⁺ que conduce a una menor producción de interferón gamma (INF- γ) y a la incapacidad de los macrófagos para destruir los amastigotes (Tremblay, Olivier et al. 1996). Las regiones más afectadas por la difusión y solapamiento de las dos enfermedades son India, Brasil y África Oriental, aunque en las últimas décadas fenómenos como la migración de zonas rurales, y la reacomodación en zonas no endémicas de la población, a causa de la guerra y conflictos armados constituyen los principales factores para la propagación de ambas enfermedades (Alvar, Aparicio et al. 2008).

Las manifestaciones clínicas de las leishmaniasis dependen de varios factores. El primero de ellos es la especie de *Leishmania* que inicia la enfermedad, en la tabla 1.2 se resume el tropismo de varias especies de *Leishmania*. En segundo lugar, factores del hospedero como estado inmunológico, medioambiental y nutricional son determinantes a la hora de poder controlar la enfermedad o por el contrario, desarrollarla de forma severa. Por último, la predisposición genética del hospedero es otro factor determinante en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad, estudios llevados a cabo en animales y humanos han permitido determinar algunos *loci* que influyen en la susceptibilidad al parásito; uno de los primeros fue el *Scl-1* y *Scl-2* -del inglés *susceptibility to cutaneous leishmaniasis*-. Este gen codifica para la proteína transportadora de cationes (Fe²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺) SLC11A1, y una mutación en este gen causa susceptibilidad a la infección, no sólo por *Leishmania* sino también por *Salmonella* y *Mycobacterium* (Huynh and Andrews 2008). Así mismo, diversos estudios han permitido identificar más de setenta genes implicados en la severidad o resistencia a la infección (revisado por Sakhianandeswaren, Foote et al. 2009), así como la presencia de diferentes haplotipos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el ratón (H2) involucrados en resistencia o susceptibilidad a LC (Awasthi, Mathur et al. 2004).

Patología	<i>Leishmania spp.</i>	Región
Leishmaniasis Cutánea	<i>L. major</i>	África y Medio oriente
	<i>L. tropica</i>	África y Medio oriente
	<i>L. aethiopica</i>	África y medio oriente
	<i>L. venezuelensis</i>	Sur América
	<i>L. mejicana</i>	Sur América
	<i>L. amazonensis</i>	Sur América
	<i>L. braziliensis</i>	Sur América
	<i>L. panamensis</i>	Sur América
	<i>L. peruviana</i>	Sur América
	<i>L. guyanensis</i>	Sur América
Leishmaniasis Mucocutánea	<i>L. braziliensis</i>	Sur América
	<i>L. panamensis</i>	Sur América
	<i>L. guyanensis</i>	Sur América
	<i>L. amazonensis</i>	Sur América
	<i>L. mejicana</i>	Sur América
Leishmaniasis Visceral	<i>L. donovani</i>	África, Medio oriente e India
	<i>L. chagasi</i>	África, Medio oriente y Mediterráneo
	<i>L. infantum</i>	África, Medio oriente y Mediterráneo
	<i>L. archibaldi</i>	África, Medio oriente y Mediterráneo
Leishmaniasis Post-kala-azar	<i>L. donovani</i>	África, Medio oriente e India

Tabla 1.2. Principales agentes etiológicos involucrados en las diferentes manifestaciones clínicas de Leishmaniasis.

1.2.3. Las leishmaniasis en España.

De las especies y subespecies de género *Leishmania*, la única especie que afecta a los habitantes de la cuenca del Mediterráneo es *L. infantum*, siendo la responsable de la aparición de la enfermedad, en la forma cutánea y visceral, tanto en humanos como en perros. Se considera que las regiones con mayores casos de leishmaniasis humanas son Cataluña, Baleares, Castilla - La Mancha y Madrid con 3 a 7 veces más que la media nacional.

La leishmaniasis canina es una enfermedad endémica con una prevalencia que varía desde 5% en Madrid hasta el 67% en Mallorca (Moreno and Alvar 2002). El perro se considera altamente susceptible aunque no todos los animales infectados desarrollan la enfermedad. Sin embargo en aquellos que la padecen cursa como una leishmaniasis viscerocutánea (LVC) similar a la LV humana. Hay evidencia que sugiere una correlación entre la incidencia de la infección canina y la incidencia en humanos, por lo que se plantea que uno de los mecanismos de controlar la enfermedad en humanos es controlar la infección en su reservorio; el perro (Alvar 2001).

1.3. Relación Parásito-Hospedero

En el momento de la picadura, el vector introduce junto con los promastigotes metacíclicos sustancias anti-agregantes plaquetarias de su saliva como la apirasa (Valenzuela, Belkaid et al. 2001), vasodilatadoras como el maxadilán y la adenosina e inmunosupresoras como la prostaglandina E2 (Lonardoni, Russo et al. 2000) las cuales producen alteraciones hemostáticas que interfieren con los mecanismos de defensa del hospedero (Kamhawi 2000).

Después de la transmisión y antes de que los parásitos entren a la célula, algunos de ellos son expuestos por un corto tiempo a diversos componentes del suero entre ellos el complemento, lo que probablemente destruya a un gran número de parásitos debido a que la activación de este sistema permite (i) la activación de los leucocitos, (ii) la opsonización del promastigote recubriéndolo con la proteína C₃b y (iii) la lisis de los promastigotes mediante el complejo de ataque a membrana C₅b-C₉ (MAC) (Puentes, Da Silva et al. 1990). Sin embargo, un buen número de ellos logra sobrevivir debido a que las formas metacíclicas son resistentes al complemento y evaden su ataque a través de varias estrategias. Los parásitos infectivos expresan una proteína kinasa serin-treonina que inactiva el complejo C₃-C₅ y C₉ por fosforilación impidiendo el ataque lítico del complemento (von Stebut 2007). Además, la glucoproteína de superficie GP63, una metaloproteasa, escinde el C₃b en forma inactiva C₃bi, facilitando la captación de los parásitos por las células que expresan el receptor para C₃bi, el CR3 (CD 11b/CD18) (Mosser and Brittingham 1997).

Una vez que el parásito escapa del ataque lítico, se adhiere rápidamente a las células del sistema mononuclear fagocítico, incluyendo células dendríticas y de Langerhans. La unión a la superficie celular incluye diferentes receptores entre ellos el receptor de manosa-fucosa, el receptor de la fibronectina y el receptor de la proteína C reactiva (Bogdan and Rollinghoff 1998). Después de la adhesión el parásito es internalizado y se localiza en compartimientos fagolisosomales los cuales maduran, se fusionan con organelos endocíticos y forman la vacuola parasitófora (VP). Esta vacuola contiene hidrolasas lisosomales, catepsinas y β-glucuronidasa (Lang, Hellio et al. 1994). Todos estos eventos facilitan que el parásito se transforme en amastigote, el cual se adapta más fácilmente al pH ácido de la vacuola, evita la degradación del mismo, por la acción de glucoproteínas y permite la multiplicación de *Leishmania* (Cunningham 2002).

1.3.1. Respuesta inmune frente a *Leishmania*

Respuesta innata frente al parásito

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son las primeras células que migran al sitio de la infección y cumplen un doble papel. Por una parte son la primera defensa contra el parásito y por otro, en su interior los promastigotes encuentran un lugar adecuado para sobrevivir, transformarse y multiplicarse (Laufs, Muller et al. 2002).

Las células fagocíticas secretan citoquinas como la IL-8, que atrae nuevos PMN al lugar de infección. Los PMN circulan por el torrente sanguíneo durante un corto período de tiempo, después del cual inician su apoptosis. *Leishmania* es capaz de retrasar esta apoptosis hasta 24 horas para aplazar las defensas del hospedero (Aga, Katschinski et al. 2002). Los PMN pueden diferenciarse en CD28⁺ ó CD28⁻. Los PMN CD28⁺ interactúan con los monocitos-macrófagos y las células dendríticas, que llegan al lugar de la infección. Esta interacción activa la síntesis de IFN-γ e interleuquina 12 (IL-12), los cuales incrementan la producción de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y permiten que se transformen en células presentadoras de antígeno (CPA).

Por otra parte, los macrófagos fagocíticos ingieren PMN CD28⁻ apoptóticos con los parásitos en su interior. De esta manera se activa mínimamente la función microbicida, ya que el parásito penetra el macrófago enmascarado por la célula apoptótica. Cuando el promastigote es internalizado en el fagosoma del macrófago, se le fusionan los lisosomas formando el fagosoma final. En

el fagosoma los parásitos son destruidos por enzimas proteolíticas y sobre todo, mediante especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, como el óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O₂⁻) y los radicales hidroxilo (OH[·]) (Muleme, Reguera et al. 2009). Estos radicales libres producen la peroxidación de los ácidos grasos de la membrana del parásito y malformaciones cromosómicas que inducen su muerte. *Leishmania* posee varias estrategias de supervivencia a este nivel; entre ellas se vale del lipofosfoglicano (LPG) para inhibir la maduración del fagosoma favoreciendo la diferenciación del promastigote. Por otra parte el amastigote secreta glicoconjugados que lo protegen del daño proteolítico (Sacks and Sher 2002).

En este punto, las CPA y las células dendríticas migran llevando los parásitos desde la zona de inoculación hasta los ganglios linfáticos regionales, donde presentan los antígenos de *Leishmania* a través de las moléculas del MHC-II a los receptores CD4⁺ de los linfocitos T para estimular la respuesta de células T. La presentación involucra la presencia de otras moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD80 que activan la producción de IL-12. Esta citoquina aumenta la producción de IFN- γ que puede unirse a los receptores del macrófago e inducir la muerte del parásito.

Sin embargo, *Leishmania* posee la capacidad de modular los mecanismos de defensa del hospedero por varias vías; regula a la baja la expresión de CD40, en los macrófagos, generando la producción de células T incapaces de responder. También impiden la carga de epítomos en el MHC-II e inducen la anergia de las células T, activan las fosfotirosinas fosfatasas del hospedero lo que afecta la vía de señalización del IFN- γ . De igual forma, los macrófagos infectados con amastigotes interactúan con células T CD4⁺ lo que induce la expansión de poblaciones CD4⁺ productoras de IL-4. La IL-4 regula a la baja la producción de IFN- γ y evita la resolución de la infección (Awasthi, Mathur et al. 2004).

Respuesta Adquirida

El establecimiento de una respuesta inmune protectora frente a *Leishmania* requiere la presentación de antígenos apropiados por parte de las células presentadoras de antígeno, la inducción y expansión de linfocitos Th1 CD4⁺ y la activación de los macrófagos para una eficiente eliminación del parásito.

Unas de las células presentadoras de antígenos más importantes, para *Leishmania*, son las células dendríticas (DCs). Estas presentan una variedad de receptores de membrana que facilitan el reconocimiento y la captura del patógeno para ser procesado y presentado eficientemente. Las DCs se pueden clasificar en dos tipos: mieloides (CD11c^{hi}) –células de Langerhans e intersticiales- y plasmocitoides (CD11c^{low}) (Banchereau and Steinman 1998). Las DCs mieloides se diferencian a su vez en CD8 α ⁺CD4⁺ y CD8 α ⁻CD4⁻. Se conoce además, la existencia de dos subpoblaciones de células dendríticas (DC1 y DC2) que producen distintas citoquinas y expresan diferentes señales coestimuladoras que contribuyen a la diferenciación de poblaciones Th1/Th2. La polarización de DCs podría responder a señales derivadas del tejido infectado por señales del patógeno, denominadas patrones microbianos o PAMPs -del inglés: *pathogen associated molecular patterns*- (Kapsenberg 2003). Diversos trabajos han descrito varios tipos de receptores PRRs -*pattern recognition receptor*-, como los receptores “Toll-like”, que pertenecen a la superfamilia de receptores de IL-1 (L-1R/TLR), y están especializados en el reconocimiento de PAMPs. Un ejemplo de PAMPs capaz de polarizar DCs hacia un tipo DC1 es el LPS (agonista del TLR4). Becker y cols. demostraron en *Leishmania* la interacción

del LPG con el TLR2 (Becker, Salaiza et al. 2003).

Cuando las DCs migran hasta los ganglios linfáticos se produce su maduración y la consiguiente activación haciéndolas potentes CPA. Este proceso de maduración está mediado fundamentalmente por la interacción entre CD40 (proteína de superficie de las DCs) y CD40L (su contraparte en las células T). Esta interacción media el aumento de expresión de moléculas del MHC-II así como también de moléculas coestimuladoras B7s. La interacción de las diferentes moléculas con sus respectivos ligandos puede generar respuestas totalmente opuestas; de esta forma la unión CD28-B7s lleva a la activación de la célula T, por otro lado la unión de B7s a CTLA-4 puede significar la inactivación y por consiguiente la no expansión de las células T. Este comportamiento no sólo se ha descrito para *L. major* sino que también ocurre tras la infección por *L. donovani*.

Estudios en ratones con *L. major* han permitido determinar los patrones de diferenciación y el perfil de citoquinas implicadas en la resistencia y susceptibilidad a la enfermedad. Así, los linfocitos T, pueden diferenciarse en varias subpoblaciones como son: Th1, Th2, T reguladoras y Th17, caracterizadas fenotípicamente por la secreción diferencial de diversos mediadores solubles como citoquinas y quimioquinas. En esta diferenciación las células dendríticas juegan un papel fundamental ya que promueven el microambiente de citoquinas y el nivel de moléculas coestimuladoras reconocidas por el linfocito T “naive” (Steinman 2007). Dentro de las moléculas específicamente secretadas por cada tipo celular podemos decir que las células Th1 producen activadores de la respuesta inmune celular tales como el IFN- γ , induciendo la producción de óxido nítrico (NO) en células fagocíticas infectadas, lo que conlleva a la eliminación del parásito (Sharma and Singh 2009). Por otra parte, las células Th2 secretan citoquinas como la IL-4 y la IL-10, que suscitan la desactivación de los macrófagos y el desencadenamiento de una respuesta inmune humoral (Okwor, Liu et al. 2009). Otras moléculas que interactúan en este microambiente de citoquinas son el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), la IL-12 y algunos interferones de tipo I. Mientras que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce una diferenciación hacia Th2, la IL-12 y los interferones de tipo I lo hacen hacia Th1 (El-On 2009).

La incapacidad del sistema inmune de derivar hacia una respuesta tipo Th1 está mediada por la producción y respuesta frente a la IL-12. El fallo en la producción de IL-12 puede estar mediado por más de una señal, entre ellas; la pérdida de la interacción CD40-CD40L y la baja producción de IL-1 por parte de la CPA, lo que conlleva a que la respuesta inmune se polarice hacia Th2. También se ha descrito que la IL-10 suprime la expresión de la IL-12 desactivando la acción leishmanicida de los macrófagos (Ronet, Hauyon-La Torre et al. 2010). Por otra parte, varios estudios utilizando ratones transgénicos han logrado identificar otros factores diferentes a la baja en la producción de IL-12 y al aumento en la producción de la IL-4 que impiden la polarización hacia Th1. Entre estos factores se encuentra la IL-13 que actúa de manera independiente de la IL-4 y los efectos de ambas pueden ser aditivos (Matthews, Emson et al. 2000) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que inhibe la producción de IFN- γ (Barral-Netto, Barral et al. 1992). Se ha llegado a proponer que la IL-6 podría, también, favorecer el desarrollo de una inmunidad no protectora (Rogers, DeKrey et al. 2002), aunque existen datos que podrían estar en contraposición con esta idea (Hirohashi and Morrison 1996).

Otro de los factores que favorece la resolución de la infección por *Leishmania* es la correcta ac-

tivación de los macrófagos, lo que involucra la producción de anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (NO) (Murray and Nathan 1999; Awasthi, Mathur et al. 2004). Esta activación está mediada por la interacción del macrófago con las células T a través de CD40-CD40L, respectivamente. La interacción entre ambas células estimula la producción de IL-12 por parte del macrófago, la que a su vez favorece la producción de IFN- γ en las células T. De esta forma el IFN- γ activa la producción de NO en aquellos macrófagos infectados, provocando la muerte y eliminación del parásito. La acción del NO se basa fundamentalmente, entre otros procesos en la S-nitrosilación de cisteínas como por ejemplo proteasas ricas en cisteínas que pierden su actividad; también, el NO puede reaccionar con aniones superóxido formando agentes altamente oxidantes como peróxido nítrico (ONOO $^-$) que puede oxidar grupos sulfhidrilo y lípidos; finalmente el NO también puede desaminar la bases del ADN dando lugar a diferentes mutaciones (MacMicking, Xie et al. 1997). Todo lo anterior conlleva a la destrucción del parásito, sin embargo la producción de NO por parte de la célula debe estar fuertemente regulada para evitar daños en el propio organismo.

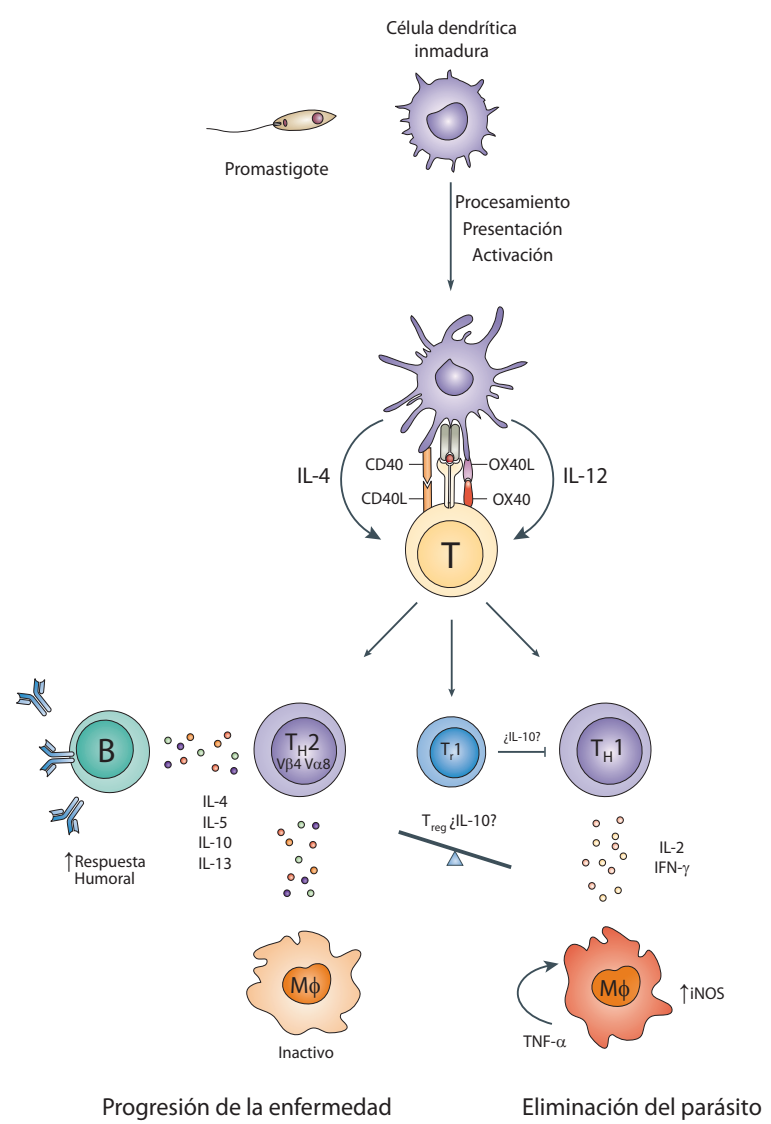


Figura 1.2. Modelo de respuesta inmune frente a *L. major*. El parásito es tomado por las células dendríticas y presentado a las células *naïve* en el contexto del MHC y el receptor de las células T. La diferenciación de la célula T es dirigida por el antígeno. Las moléculas coestimuladoras y el medio ambiente de citoquinas pueden polarizar la respuesta hacia una diferenciación de células Th2 ó Th1.

En resumen, una respuesta inmune efectora frente a *Leishmania* parece que debe involucrar la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas y los macrófagos generando la diferenciación de los linfocitos T naïve en células Th1. Esta población celular así como las natural killer producen INF- γ , que en combinación con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), activan el gen de la oxido nítrico sintasa (iNOS), dando como resultado la producción de NO que es tóxico para el parásito.

El Receptor de las Células T

El equilibrio entre una respuesta inmune protectora o deletérea es una característica común entre las infecciones causadas por patógenos que logran manipular el sistema inmune del hospedero. En ese contexto, determinar la subpoblación de linfocitos implicada en patología o protección es importante en el momento de diseñar vacunas contra los diversos agentes infecciosos. Durante el curso de la infección por *Leishmania*, se sabe que las células T juegan un papel importante en la mediación de la respuesta celular contra el parásito. Esta población celular reconoce antígenos extraños a través del receptor de antígeno de las células T (TCR).

EL TCR es una glicoproteína heterodimérica unida a puentes disulfuro y anclada a la membrana de las células T. Está compuesto por una cadena α (TCRA) y una cadena β (TCRB). Un pequeño porcentaje de células expresa receptores $\gamma\delta$, pero los más predominantes en las células de mamíferos son los $\alpha\beta$. La secuencia primaria, la organización génica, los modos de reagrupación y la estructura de los heterodímeros $\alpha\beta$ es similar al fragmento Fab de las inmunoglobulinas (Goldrath and Bevan 1999). Las cadenas α están formadas por los segmentos V_α , J_α y C_α y las cadenas β por los segmentos V_β , J_β , D_β y C_β . Un TCR funcional es generado por el modo de reagrupación y yuxtaposición de estos segmentos génicos, así como por la adición de diversidad no codificada en la línea germinal en las uniones VDJ (García, Teyton et al. 1999). En la cadena β la variabilidad se genera mediante dos mecanismos (Lieber 1991; LaRocque and Robinson 1996; García, Teyton et al. 1999):

1. La recombinación somática de los elementos VDJ
2. La diversificación de la región N (espacio entre la región D-V, por una parte y D-J por la otra) que involucra:
 - a. La eliminación de nucleótidos dada las imprecisiones de la recombinación
 - b. La inserción aleatoria de nucleótidos.

De esta forma, para que un reordenamiento VDJ produzca un TCR funcional, el procesamiento de las regiones D y J, junto con las eliminaciones o inserciones de nucleótidos, deben producir fragmentos cuyos tamaños sigan las variaciones del codón, es decir, 3 pares de bases (Pannetier, Cochet et al. 1993).

La especificidad del TCR por sus ligandos naturales (péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC) se concentra en tres regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) -del inglés *Complementary-Determining Regions*- conocidas como CDR1, CDR2 y CDR3, presentes en ambas cadenas α y β .

La diversidad del repertorio de los linfocitos T puede ser estudiada por medio del análisis de la longitud del CDR3 de la cadena β (Pannetier, Cochet et al. 1993; Pannetier, Even et al. 1995). Esta

región contiene la mayor variabilidad del TCR lo que permite definir un clon único de TCR (Gorski, Yassai et al. 1994). Asimismo, al ser la región que está en contacto estrecho con el péptido presentado en contexto del MHC, es un reflejo de qué subpoblación de linfocitos T en particular está respondiendo ante la presencia de un antígeno.

El tamaño final del CDR3 puede variar entre 6 y 15 aminoácidos en ratones, es decir que su rango de variación es de 0 a 27 nucleótidos (Pannetier, Cochet et al. 1993). La secuencia del CDR3 define un clon único de TCR y actúa como la huella digital del linaje de células T que la porta. La frecuencia con que se encuentra un tipo de clon particular de TCR puede ser tomada como una medida de expansión clonal (Gorski, Yassai et al. 1994).

El tamaño de la región CDR3 se determinó por amplificación del ADNc proveniente de linfocitos T utilizando oligodeoxinucleótidos correspondientes a cada una de las 24 familias V β descritas para ratón. El análisis de los productos de PCR por electroforesis capilar en un secuenciador automático revelará los tamaños predominantes de la región CDR3 correspondientes a cada una de las familias V β . Ésta técnica que se conoce como inmunoscopia o espectratipificación, ha sido utilizada en el análisis del repertorio de células T en pacientes trasplantados (Le, Melenhorst et al. 2011), así como en modelos animales con malaria cerebral (Collette, Bagot et al. 2004), entre otros.

En el caso de LC causada por *L. major* en ratones BALB/c la existencia de una población oligoclonal de células T con el receptor V β 4Va8 se ha relacionado con la susceptibilidad que presenta este modelo frente a la infección (Reiner, Wang et al. 1993). Por otra parte, Clarêncio y cols. analizaron la variabilidad del repertorio V β en pacientes con leishmaniasis cutánea por medio de citometría de flujo. Encontraron que la infección con parásitos vivos puede modular el repertorio TCR V β sugiriendo que la familia V β 12 podría estar implicada en la respuesta a *Leishmania* (Clarencio, de Oliveira et al. 2006).

1.4. Modelos de Infección experimental

1.4.1. Modelos de Leishmaniasis cutánea en ratón.

El modelo de preferencia utilizado para el estudio de las leishmaniasis es el ratón. En él se obtuvieron las primeras evidencias de la relevancia *in vivo* del balance Th1/Th2. En las principales cepas de ratones utilizadas en el estudio del parásito (C57BL/6, C3H, CBA) la infección genera lesiones cutáneas similares a las de los humanos. Estas lesiones se curan de forma espontánea debido a que estas cepas generan una respuesta tipo Th1 cuyo principal producto es el IFN- γ . Esta citoquina induce la producción de NO en los macrófagos parasitados, iniciando así el proceso de destrucción y eliminación del parásito. El balance de la respuesta Th1/Th2 esta mediado por las diferentes citoquinas sintetizadas por las CPA, de esta forma altas dosis de IL-4 inducen una respuesta Th2 y por otra parte, la presencia de IL-12 induce la respuesta del tipo Th1. Cabe mencionar que estas cepas resistentes a la infección con *L. major* pueden no serlo frente a otras especies como *L. amazonensis* o *L. mexicana*, lo que sugiere la presencia de factores específicos del parásito que están determinando el desarrollo de la enfermedad (McMahon-Pratt and Alexander 2004).

Otra cepa de ratón utilizada en el estudio de la enfermedad es la BALB/c, cuya principal característica es la generación de una respuesta de tipo Th2. Esta cepa es susceptible a la enfermedad,

no es capaz de controlar la enfermedad por inhabilidad para detener el crecimiento del parásito al interior de la célula infectada. La susceptibilidad en estos ratones está asociada a una síntesis temprana de IL-4, lo que se traduce en una polarización hacia una respuesta Th2. Esta expresión temprana de IL-4 no ha sido detectada en los ratones C57BL/6 (Launois, Ohteki et al. 1995) por lo tanto, es considerada como el primer factor en la susceptibilidad. Se sugiere que la producción temprana de IL-4 está mediada por la interacción del antígeno LACK de *Leishmania* (homóloga en *Leishmania* de la proteína quinasa C activada) con una población oligoclonal de células T CD4⁺ que presentan en su receptor de células T (TCR) el heterodímero Vβ4-Vα8 específico contra este antígeno (Reiner, Wang et al. 1993; Sacks and Noben-Trauth 2002). Se ha propuesto que esta población específica de células T CD4⁺ Vβ4-Vα8 induce una temprana síntesis de IL-4 debido a que su TCR presenta una baja afinidad por el complejo MHC-péptido (Malherbe, Filippi et al. 2000).

Se ha demostrado que la IL-4 no es necesaria como único activador de la respuesta Th2 (Noben-Trauth, Lira et al. 2003). Algunas evidencias obtenidas en ratones deficientes en esta citoquina indican que la IL-13 puede tener funciones similares a la IL-4, ya que interacciona con el receptor para IL-4 (IL-4R) (Chomarat and Banchereau 1998; Rogers, DeKrey et al. 2002). Por otra parte, se ha comprobado que ratones que no presentan el receptor para la IL-4 y en aquellos en los cuales se ha bloqueado la IL-13 mantienen el fenotipo susceptible. Este hecho puede ser atribuido a que otros mecanismos diferentes a estas citoquinas inducen la polarización hacia Th2 o bien que este fenómeno ocurre *per se* si no se hayan las señales que polaricen hacia Th1.

Por otra parte, la susceptibilidad y resistencia a *Leishmania* en ratones está asociada con la aparición de un subgrupo de células T denominadas T reguladoras (Treg) y con los niveles de IL-10 producida por una subpoblación de dichas células. Estudios realizados en ratones BALB/c deficientes en IL-10 han demostrado que generan resistencia a la enfermedad, lo que indica que la IL-10 podría estar relacionada con la progresión de la misma (Padigel and Farrell 2005). El mecanismo de regulación está mediado por células del tipo T reguladoras (Belkaid, Sun et al. 2006), es así como poblaciones del tipo CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ que producen IL-10 e IFN-γ, respectivamente, mantienen el delicado equilibrio entre la respuesta inmune efectora y la supresora de las células T en el contexto de una infección crónica por LC (Belkaid, Piccirillo et al. 2002). Otros hallazgos han permitido determinar que las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, se acumulan en el sitio de la lesión (Belkaid 2008) y además, la expansión de dicha población generada por antígenos del parásito conducen a la producción de IL-10. La presencia de IL-10 conlleva el aumento de la susceptibilidad o pérdida de la resistencia en el modelo animal (Mendez, Reckling et al. 2004; Stober, Lange et al. 2005; Okwor and Uzonna 2008; Okwor, Liu et al. 2009).

La inoculación de ratones con *L. major* ha permitido determinar que otra población celular, los linfocitos T CD8⁺, están involucrados en la respuesta del hospedero frente a una reinfección y podrían participar en la generación de memoria en la respuesta inmune frente a *Leishmania*. Esto se ha demostrado en condiciones experimentales muy definidas, por ejemplo, ratones BALB/c reinfectados con parásitos vivos presentan un fenotipo que genera protección frente a la enfermedad, asociado a la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos T CD8⁺ (Awasthi, Mathur et al. 2004) y que la activación de esta población celular está mediada por las CPAs en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) (Guerfali, Ben-Abdallah et al. 2009). Sin embargo, otros

estudios han permitido determinar que las CD8⁺ son esenciales para el desarrollo de una inmunidad natural adquirida frente a una infección primaria en ratones resistentes C57BL/6, siguiendo un modelo de infección natural (Belkaid, Von Stebut et al. 2002) y que poseen una función complementaria, más no redundante, con los linfocitos T CD4⁺ para mantener procesos reguladores y efectores que le permiten al hospedero montar una respuesta tipo Th1 capaz de eliminar el parásito (Gurunathan, Stobie et al. 2000; Rhee, Mendez et al. 2002; Jordan and Hunter 2010).

En este contexto, las diferencias entre resistencia y susceptibilidad en los ratones puede estar asociada a varios factores, uno de ellos es que cepas resistentes como los C57BL/6, J6 y CBA producen citoquinas que activan los macrófagos por la vía clásica para producir NO a través de iNOS, esto facilita la muerte del parásito, la resolución de la enfermedad y al adquisición de una inmunidad protectora dependiente de la presencia de parásitos persistentes. En contraste, las cepas susceptibles (BALB/c) producen una respuesta tipo Th2 caracterizada por la producción de altos niveles de IL-4, IL-13 e IL-10 las cuales activan el macrófago por la vía alterna e incrementan la producción de poliaminas favoreciendo el crecimiento y la proliferación del parásito (Iniesta, Gomez-Nieto et al. 2002; Muleme, Reguera et al. 2009). Además, una de las causas por la cual la cepa BALB/c es susceptible, podría estar relacionada con la existencia de diferencias genéticas en los mecanismos de producción de IL-12 o en la respuesta a esta citoquina. Los ratones BALB/c poseen una señalización deficiente a través del receptor de IL-12 debido a una baja expresión en la subunidad $\beta 2$ del receptor (IL-12R $\beta 2$) que es independiente de la IL-4 (Rogers, DeKrey et al. 2002). Sin embargo, este proceso ha sido cuestionado ya que se ha comprobado que ratones BALB/c transgénicos, que expresan constitutivamente la subunidad $\beta 2$ del receptor de la IL-12 continúan siendo susceptibles a la infección a pesar de estabilizar la señal de respuesta a la IL-12 y a STAT4 (Nishikomori, Gurunathan et al. 2001). Aquí vale la pena resaltar que otros componentes de la respuesta innata provocan una inducción deficiente de la respuesta Th1 en los ratones BALB/c y se ha demostrado, además, que una de las mayores diferencias radica en que las células dendríticas CD11b⁺ de ratones resistentes B10.D2 producen altas cantidades de IL-1 mientras que los BALB/c producen niveles relativamente bajos (Sacks and Anderson 2004). No obstante, la IL-1 no es el único factor responsable de la susceptibilidad frente al parásito, también se han encontrado que en los ratones BALB/c el parásito se disemina desde el lugar de inoculación hasta el bazo e hígado, mientras que en los ratones resistentes el parásito es contenido en la almohadilla plantar y el ganglio drenante (Laskay, Diefenbach et al. 1995).

También, se ha descrito que el entorno inflamatorio en el que tiene lugar la infección puede influenciar en el mantenimiento de una respuesta Th2. Los neutrófilos infiltrados en el punto de la infección se mantienen por varias semanas en una alta proporción en la almohadilla plantar en el ratón BALB/c, mientras que en los ratones C57BL/6 sólo aparecen de forma transitoria. Una depleción de los neutrófilos en los ratones BALB/c podría inhibir la respuesta temprana de IL-4 y promover una resistencia parcial (Tacchini-Cottier, Zweifel et al. 2000; Laskay, van Zandbergen et al. 2003).

Se ha demostrado además, que cepas resistentes a la infección por *L. major* generan también resistencia a la reinfección. De hecho, se ha relacionado que la persistencia del parásito en el sitio de la infección primaria es indispensable para el desarrollo de una respuesta inmune a largo plazo frente a la enfermedad. Dentro de los factores involucrados en dicha respuesta se encuentran; (i) poblaciones de células T de memoria que expresan altos niveles del receptor CD62L low y CD62L

high, las cuales median una respuesta de memoria a corto plazo (dos semanas) o largo plazo (más de seis semanas, respectivamente); y (ii) las poblaciones de células regulatorias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Okwor and Uzonna 2008).

Para finalizar, es importante decir que existen datos que afirman que los ratones BALB/c no siempre son susceptibles a la infección, ya que el desarrollo de una lesión en dichos animales se logra con la inoculación por vía subcutánea (s. c.), normalmente en la almohadilla plantar, de un número alto de promastigotes en fase estacionaria (de 10⁴ – 10⁷). Sin embargo, estos ratones muestran un fenotipo resistente al ser inoculados por vía s. c. con bajas dosis de parásitos (Uzonna, Wei et al. 2001). Por el contrario, se ha reportado que la inoculación por vía intradérmica (i. d.) en la oreja con un bajo número de promastigotes (10 – 100) puede generar lesiones que no se controlan (Courret, Lang et al. 2003).

En conclusión se puede decir que la susceptibilidad en el modelo animal está mediada por el desequilibrio en las funciones de las células T reguladoras, así como las deficiencias genéticas para generar una respuesta Th1 que redireccione la respuesta Th2 inicial y la existencia de poblaciones celulares que inhiben la respuesta efectora (Sacks and Anderson 2004). Todos estos aspectos deben ser tenidos en cuenta y ser analizados con detalle a la hora de diseñar vacunas contra *L. major*.

1.5. Diagnóstico, control y tratamiento de la leishmaniasis.

Para el correcto diagnóstico de la leishmaniasis se deben considerar criterios como datos epidemiológicos, características clínicas y los resultados de las pruebas de laboratorio (Goto and Lindoso 2010). Los análisis de laboratorio buscan encontrar el agente etiológico a partir de una muestra obtenida de la lesión. En este contexto, se examinan biopsias de tejido, frotis de impresiones de la lesión o aspirados de médula ósea o ganglio las cuales se tiñen principalmente con colorantes como giemsa o hematoxilina-eosina y se observan directamente al microscopio, sin embargo su sensibilidad varía de un 50% - 70% (Vega-Lopez 2003; Al-Hucheimi, Sultan et al. 2009). La posibilidad de hacer un diagnóstico visual acompañado del crecimiento del parásito en cultivo, aumenta la sensibilidad en un 85% (Murray, Berman et al. 2005). En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR). Estos métodos buscan amplificar diferentes secuencias específicas del ADN genómico o del kinetoplasto (Boggild, Valencia et al. 2010).

También se han desarrollado métodos inmunológicos de diagnóstico como la prueba de hipersensibilidad retardada contra *Leishmania* o prueba de Montenegro (Nogueira, Goto et al. 2008). Sin embargo, este método presenta algunas deficiencias pues no permite distinguir entre una infección pasada y una actual. Otras pruebas indirectas de serodiagnóstico como la inmunofluorescencia indirecta (IIFA) y el ELISA se basan en la detección de anticuerpos contra proteínas totales del parásito o proteínas recombinantes. Dentro de estas últimas se encuentra la rK39 (Braz, Nascimento et al. 2002), o la proteína multiantigénica Q que posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 96% (Soto, Requena et al. 1998), entre otras.

El tratamiento farmacológico de la leishmaniasis existe desde principios del siglo XX, no obstante son muy pocos los medicamentos desarrollados para tal fin. Los antimoniales pentavalentes (Sb^v) son la primera línea de elección para el tratamiento, de ellos se conocen dos formulaciones:

(i) antimonio de meglumina (Glucantime® Rhône-Poulenc Rorer, Francia), (ii) estibogluconato de sodio (Pentostam® Glaxo-SmithKline R.U). En la segunda línea de tratamiento se encuentran la Anfotericina B y la Pentamidina. La eficacia de estos medicamentos varía de acuerdo a la región geográfica, a las especies de *Leishmania* y a la presentación clínica de la enfermedad. También se eligen de acuerdo al estado del paciente pues todos ellos generan efectos secundarios bastante serios. En la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden a curar la enfermedad se han probado otros medicamentos, considerados como drogas alternativas, dentro de las que se encuentran la Metilfosina, los Azoles, la Paromomicina, la Azitromicina, Dapsone y Rifampicina, que usados solos o en compañía de Sb^v han mostrado resultados prometedores en algunas regiones (Goto and Lindoso 2010). La inmunoterapia e inmuoquimioterapia también han sido usadas para acelerar la respuesta inmune específica, para ello varias aproximaciones se han desarrollado hasta el momento (revisado por El-On 2009).

El control del vector radica principalmente en el uso de mosquiteros o soluciones repelentes. Los programas de fumigación de viviendas con insecticidas también se realizan pero para la mayoría de países endémicos se hacen insostenibles, debido al alto costo. El uso de collares, para perros, impregnados con soluciones repelentes también constituye una alternativa, sobre todo para evitar la propagación de la leishmaniasis visceral.

1.5.1. Vacunas basadas en la administración de parásitos vivos, atenuados o muertos

La primera descripción de una vacunación que utilizó parásitos vivos data de más de un siglo cuando las tribus de beduinos exponían las nalgas de sus bebés a la picadura de la mosca de la arena para protegerlos de una posterior lesión en el rostro. Este método conocido como leishmanización fue usado por largo tiempo en las repúblicas que conformaban la antigua Unión Soviética, Isarel e Irán pero con el tiempo su uso fue eliminado debido a problemas de seguridad, ya que algunos individuos vacunados con los parásitos virulentos desarrollaban a lo largo del tiempo lesiones que no cicatrizaban.

Posteriormente en el siglo XX, durante los años treinta, científicos de Brasil propusieron el uso de vacunas con parásitos muertos. Varias estrategias han sido desarrolladas desde entonces; el uso de una vacuna que contiene promastigotes de cinco cepas de *Leishmania*, la cual mostró ser segura pero solamente generó un 50% de protección (Noazin, Modabber et al. 2008). Más tarde se analizó el efecto protector de otra vacuna llamada Leihsvacin que contiene únicamente una de las cepas iniciales (de la mezcla de cinco cepas) pero los ensayos mostraron que a pesar de ser segura no fue eficaz (Velez, Gilchrist et al. 2005). Otros ensayos de vacunación basados en el empleo de parásitos muertos han sido realizados mostrando algún grado de protección (revisado por Handman 2001).

El uso de parásitos vivos atenuados ha sido otra de las opciones probadas en la búsqueda de una vacuna contra la leishmaniasis, los organismos atenuados producen una enfermedad transitoria pero no patogénica en el hospedero y permiten el desarrollo de una respuesta inmune adecuada similar a la que se genera en la infección natural. Dentro de los genes eliminados en *L. major* se encuentran el gen que codifica para el LPG (*lpg1*) y el gen que codifica para un transportador de aparato de Golgi (*lpg2'*). Sin embargo, estos mutantes pueden revertir y causar infección (Launois,

Tacchini-Cottier et al. 2008).

El uso de parásitos vivos que contienen dos genes suicidas (el gen de la timidina kinasa *-tk-* del virus del herpes simplex-1 y el gen de la citosina deaminasa *-cd-* de *Saccharomyces cerevisiae*) fueron probados juntos y por separado en ratones BALB/c encontrando que las lesiones causadas por el parásito se curaron después de dos semanas de tratamiento y los animales no presentaron ningún signo de lesión después de cuatro semanas, generando una respuesta inmune robusta y protectora contra la reinfección (Davoudi, Tate et al. 2005).

1.5.2. Vacunas basadas en moléculas definidas

Otra alternativa en la búsqueda de una profilaxis contra la leishmaniasis ha sido la generación de vacunas con antígenos definidos del parásito. Esta aproximación ha permitido identificar nuevas proteínas antigénicas, crear fusiones de proteínas, optimizar las proteínas para generar un máximo de inmunogenicidad y desarrollar formulaciones con adyuvantes que promuevan una respuesta Th1 apropiada capaz de generar protección.

Uno de los antígenos más ampliamente estudiado es la Gp63. Cuando se usa como proteína recombinante, no genera protección frente a *L. major* (Handman, Button et al. 1990). No obstante cuando la inmunización se hace con la proteína nativa purificada induce protección frente al reto con *L. major* (Rivier, Bovay et al. 1999). Múltiples ensayos de vacunación han sido realizados con Gp63 expresado en diferentes sistemas (Connell, Medina-Acosta et al. 1993; Abdelhak, Louzir et al. 1995). Pero los resultados han sido cuestionados debido a la variedad de respuestas Th2 que generan en humanos (Russo, Burns et al. 1991; Kedzierski 2010).

La inmunización con polipéptidos derivados de la Gp46 o PSA-2 protege a los ratones de la infección (Handman, Symons et al. 1995), pero la vacunación con la proteína recombinante no logra generar una respuesta protectora efectiva que permita polarizar la respuesta hacia Th1 (Sjolander, Baldwin et al. 1998).

Un estudio inicial con el antígeno LACK administrado en ratones susceptibles BALB/c demuestra que son capaces de controlar la infección causada por *L. major* (Julia, Rassoulzadegan et al. 1996), sin embargo hallazgos posteriores permitieron determinar que LACK promueve la expansión de células T secretoras de IL-4 generando una respuesta de tipo Th2 (Launois, Maillard et al. 1997). A pesar de ello, el antígeno LACK ha sido probado en varios sistemas de expresión y con diferentes adyuvantes (revisado por Kedzierski, Zhu et al. 2006).

Otra gran diversidad de proteínas del parásito se han caracterizado y evaluado en estudios de protección, entre ellos tenemos la Dp72 (Rachamim and Jaffe 1993); la proteína ácida del ribosoma P0 (Iborra, Carrion et al. 2005); las cisteín proteasas -CPB y CPA- (Rafati, Baba et al. 2000; Rafati, Karimnia et al. 2002); las proteínas del amastigote P4 y P8 (Soong, Duboise et al. 1995), entre otras.

Una de las moléculas más destacadas dentro de esta segunda generación de vacunas es la Leish—111f. Está compuesta por la fusión de tres antígenos; dos de ellos de *L. major* -la antioxidante tiol específica (TSA) y la proteína inducible de estrés 1 (STI1)- y uno de *L. amazonensis* -el factor de iniciación de elongación (LeIF)- (Reed, Coler et al. 2003). Los ensayos de inmunización iniciales en ratones han demostrado que Leish-111f es capaz de proteger a los ratones de la infección por *L.*

major y *L. amazonensis* (Skeiky, Coler et al. 2002). Esta vacuna se encuentra en la actualidad en fase I de experimentación (Kedzierski 2010). En la tabla 1.3 se resume gran parte de los estudios realizados con las vacunas de segunda generación y las moléculas analizadas para proteger contra LC.

Antígeno	Forma de la Vacuna	Modelo Animal	Protección
LPG	Antígeno Nativo	Ratón	Sí
	Antígeno Nativo + BCG	Ratón	No
Gp63	Proteína recombinante	Ratón	No
	Proteína recombinante	Monos	Protección parcial
	Antígeno nativo	Ratón	Sí
	Proteína expresada en BCG	Ratón	Sí
	Proteína expresada en <i>Salmonella</i>	Ratón	Sí
	CDs pulsadas con péptidos sintéticos	Ratón	Variable
	CDs pulsadas con antígeno nativo	Ratón	Sí
Gp46 PSA-2	Antígeno nativo	Ratón	Sí
	Proteína expresada en virus vaccinia	Ratón	Sí
p36 LACK	Proteína recombinante +IL-12	Ratón	Sí
	Proteína expresada en <i>Listeria monocytogenes</i>	Ratón	Parcial
Dp72	Antígeno nativo	Ratón	Sí
P0	Proteína recombinante	Ratón	Variable
CP	Proteína recombinante	Ratón	Parcial
CPB	Proteína recombinante	Ratón	Parcial
	Vacuna de DNA	Ratón	Parcial
CPA/CPB	Fusión proteínas recombinantes	Ratón	Parcial
A2	Antígeno nativo	Ratón	Parcial
P4	Antígeno nativo	Ratón	Sí
P8	Antígeno nativo	Ratón	Sí
KMP-11	CDs pulsadas con antígeno nativo	Ratón	Sí
LmSTI1	Proteína recombinante	Ratón	Sí
	Proteína recombinante	Monos	Sí
TSA	Proteína recombinante	Monos	Sí
	Proteína recombinante	Ratón	Sí
Leish-111f	Poliproteína recombinante de TSA, LmSTI1 y LelF	Ratón	Sí

Tabla 1.3. Resumen de las vacunas con moléculas definidas para LC. DC: Células dendríticas; CP: Cisteín Proteinasa; BCG: *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (adaptada de Kedzierski, Zhu et al. 2006; Nagill y Kaur 2011).

Por otra parte, la glándula salival del vector y algunos componentes de la saliva han sido considerados como posibles candidatos a vacunas (revisado por Launois, Tacchini-Cottier et al. 2008; de Oliveira, Nascimento et al. 2009) ya que ensayos en ratones BALB/c han demostrado que inducen protección, sin embargo los mecanismos de acción no están completamente claros y la respuesta inmune generada es dependiente de la especie de *Leishmania*.

1.5.3. Vacunas de ADN

En 1990 Wolff y colaboradores describieron que la simple inyección intramuscular de un plásmido de ADN podía transfectar células musculares *in vivo* (Wolff, Malone et al. 1990). Por otro lado, Ulmer y colaboradores demostraron que una vacuna de ADN que contenía codificada una proteína contra el virus de la influenza lograba generar inmunidad protectora contra el reto viral en un modelo preclínico (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Desde su descubrimiento una gran cantidad de antígenos han sido analizados no solo para prevenir un amplio rango de enfermedades causadas por virus, bacterias y parásitos sino que también han sido empleadas en el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes y alergias (Carvalho, Rodgers et al. 2010)

Las vacunas de ADN están compuestas por un plásmido dentro del cual se introducen secuencias de ADN amplificadas a partir del genoma del patógeno y pueden corresponder a un gen completo o epítomos seleccionados. Una vez suministrada, la vacuna es tomada por las células receptoras donde se produce la síntesis del antígeno el cual es expresado y presentado a las células del sistema inmune. Estas vacunas son capaces de inducir respuestas humorales o celulares de tipo CD4⁺ y CD8⁺, las cuales pueden ser moduladas además, por la adición de citoquinas y/o oligonucleótidos tipo CpGs (Alarcon, Waite et al. 1999; Restifo, Ying et al. 2000). Otra forma de modular la respuesta suscitada por estas vacunas es mediante la estrategia de “*prime-boost*” que implica realizar la primera inoculación con la vacuna de ADN y una segunda inmunización con la proteína (McShane 2002; Iborra, Carrion et al. 2005). Esta última estrategia ha sido utilizada frecuentemente en las vacunas frente a *Leishmania* con algún éxito, debido a la inducción de una respuesta celular de tipo Th1 con poblaciones de linfocitos T CD8⁺ anti-*Leishmania* (Kedzierski, Zhu et al. 2006). Hasta el momento, existen múltiples datos del desarrollo de inmunizaciones con vacunas de ADN, las cuales muestran diferentes grados de protección contra las diferentes formas de leishmaniasis en varios modelos animales (revisado por Nagill and Kaur 2011). En la tabla 1.4 se muestran los genes testados en forma de vacunas de ADN para LC.

El análisis de la respuesta inmune generada por la inmunización con vacunas de ADN ha demostrado que la inmunidad protectora está correlacionada con el desarrollo de una respuesta Th1 y la producción de IFN- γ . Es importante destacar que los mecanismos inmunológicos que regulan la infección por *Leishmania* varían de acuerdo al modelo animal usado y a la forma de la enfermedad. Asimismo, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos en los modelos animales no necesariamente reflejan los eventos inmunológicos que pueden ocurrir en el humano. Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta a la hora de realizar un diseño racional de las vacunas.

Antígeno	Adyuvante/Sistema de Transporte	Modelo	Especie de <i>Leishmania</i>	Reducción Carga Parasitaria (%)
Lack	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	42
Lack	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	56
HPB-Lack ^a	pcDNA3-Vaccinia Virus	Ratón	<i>L. major</i>	68
Lack	pCMV3ISS	Ratón	<i>L. major</i>	26
Gp63	pCMV3ISS	Ratón	<i>L. major</i>	21
P20	pCMV3ISS	Ratón	<i>L. major</i>	20
PSA2	pCMV3ISS	Ratón	<i>L. major</i>	26
TSA	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	84
LmSTI1	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	32
TSA+LMSTI1	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	90
H2A+H2B+H3+H4	pcDNA3	Ratón	<i>L. major</i>	74
Cpa+Cpb	pCB6	Ratón	<i>L. major</i>	38
P4	pcDNA3	Ratón	<i>L. amazonensis</i>	25
P4	pcDNA3+HSP70	Ratón	<i>L. amazonensis</i>	60
P4	pcDNA3+IL-12	Ratón	<i>L. amazonensis</i>	99
NH36	VR1012	Ratón	<i>L. mexicana</i>	65
NH36	VR1012	Ratón	<i>L. amazonensis</i>	81

Tabla 1.4. Candidatos para una vacuna de tercera generación contra Leishmaniasis cutánea (adaptado de Palatnik-de-Sousa 2008).

1.6. Los oligodeoxinucleótidos con motivos CpG como adyuvantes

Los adyuvantes (del latín *adjuvare*, ayudar) son compuestos que aumentan y/o modulan la inmunogenicidad intrínseca del antígeno. Para que una vacuna sea efectiva, no sólo debe contener los epítomos (B ó T) adecuados sino que también debe generar una respuesta inmune protectora.

En 1992 Yamamoto y cols. reportaron que oligodeoxinucleótidos (ODNs) sintéticos con secuencias patrón encontrados en el ADN de las bacterias pueden activar las células natural killer para secretar IFN- γ y generar una respuesta inmune mediada por células (Yamamoto, Yamamoto et al. 1992). Estos motivos CpG, presentes en bacterias, son secuencias palindrómicas de dinucleótidos no metilados, flanqueados por dos purinas en la región 5' (principalmente GpA) y dos pirimidinas en la región 3' (Klinman, Currie et al. 2004); estas secuencias son más abundantes en el ADN de procariontes que en eucariotes, sin embargo en estos últimos las citosinas están metiladas, mientras que en los procariontes esta metilación ocurre con poca frecuencia.

Los motivos CpG poseen la capacidad de suscitar una cascada inmuno-estimuladora que induce la maduración, diferenciación y proliferación de múltiples células del sistema inmune incluidas las células B y T, macrófagos, *natural killer* y monocitos/macrófagos que producen IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18, IFN- γ y TNF- α (Krishnamachari and Salem 2009).

El sistema inmune innato posee patrones de reconocimiento de receptores (PRRs), dentro de los que se encuentran los TLRs -del inglés *Toll-like receptors*- que se expresan sobre la superficie de las células (TLR 1, 2, 4, 5 y 6) o dentro del compartimento endosómico (TLR 3, 7, 8 y 9) (Heeg, Dalpke et al. 2008). Los TLRs endosómicos son los responsables del reconocimiento de patógenos que han sido fagocitados o que han invadido las células (Akira and Hemmi 2003). Hemmi y cols. es-

tablecieron que el TLR9 en ratón es el responsable del reconocimiento de los motivos CpG por parte de las células del sistema inmune (Hemmi, Takeuchi et al. 2000). Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente para humanos. La interacción del TLR9 con los CpG ODNs dispara la inducción de una respuesta inmune mediada por células presentadoras de antígeno como las DCs para producir IL-12 y otros factores solubles; también esta interacción induce inflamación y facilita la acidificación de la vesícula endosómica generando especies reactivas de oxígeno. Así mismo, inducen un cambio de isotipo de anticuerpos resultando en un aumento significativo de IgG2a (relacionado con respuestas Th1) (Klinman, Klaschik et al. 2009).

Los ODN CpG estimulan tanto la respuesta humoral como la celular cuando son coadministrados con vacunas frente a diversos patógenos. En el caso de *Leishmania* un estudio realizado inoculando bajas dosis de promastigotes metacíclicos, como vacuna, logró demostrar que la inclusión de ODNs CpG con los promastigotes acelera la generación de células CD4⁺ secretoras de IFN- γ específico contra el patógeno, lo que conduce a una reducción de la carga parasitaria (Mendez, Tabbara et al. 2003). Asimismo, la administración de la proteína rLiP0 coadyuvada con CpG en ratones BALB/c induce una protección parcial frente a la infección con *L. major*, relacionada con un retraso en la inflamación de la almohadilla plantar y una reducción en la carga parasitaria en el ganglio drenante a las cuatro semanas después de la infección. No obstante, estos ratones desarrollaron lesiones no cicatrizantes y no controlaron la infección (Iborra, Carrion et al. 2005).

Un estudio realizado con una proteína recombinante que contiene los antígenos LmSTI1, TSA y LeiF con ODN CpG como adyuvante indujo protección, considerada de larga duración (12 semanas después de la vacunación), tanto para el modelo de infección en ratones BALB/c como C57BL/6. La resistencia a la infección se relacionó con la activación de células T CD8⁺, la cual se pierde si esta población celular se elimina en el momento de la vacunación. Esto podría sugerir que los ODNs con motivos CpG tienen la capacidad de inducir una respuesta protectora frente a LC dependiente de células T CD8⁺ (Rhee, Mendez et al. 2002). Adicionalmente, un trabajo realizado utilizando proteínas del ribosoma de *L. major* (LPR) que fueron inoculadas con CpGs, demostró que la protección, tanto en ratones BALB/c como en C57BL/6 se asocia a una producción de IFN- γ dependiente de IL-12 producida principalmente por células CD4⁺ (Iborra, Parody et al. 2008).

1.7. La proteína Q de *Leishmania*

Estudios previos realizados sobre una librería de expresión de *L. infantum* con sueros de perros que padecían leishmaniasis activa permitió identificar las proteínas ácidas del ribosoma LiP2a y Lip2b como determinantes antigénicos específicos para leishmaniasis (Soto, Requena et al. 1995 a). Estas proteínas recombinantes utilizadas como herramienta en el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral permiten diferenciar entre una infección causada por *L. infantum* de una causada por *T. cruzi* (Soto, Requena et al. 1996).

La proteína LiP0, también fue reconocida por un alto porcentaje de sueros de perro con leishmaniasis visceral (Soto, Requena et al. 1995 b). Además se determinó que posee determinantes antigénicos en la región C-terminal.

Por otra parte, el estudio realizado con la histona H2A, demostró que durante la infección esta proteína es un blanco importante de la respuesta inmune humoral, además fue reconocida por el

78% de los sueros probados. Se pudo establecer también que los determinantes antigénicos se ubican en las regiones amino terminal y carboxilo terminal de la proteína (Soto, Requena et al. 1995 c).

Este amplio conocimiento acerca de los epítomos B de estas proteínas condujo a la obtención de una construcción que contiene las regiones codificantes para los determinantes antigénicos de las proteínas LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0. Esta nueva molécula conocida como Proteína Q se generó con la idea de ser utilizada como herramienta en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina. La Proteína Q -PQ- es una molécula con un peso molecular de 38 kDa, tiene un punto isoeléctrico de 7,37, puede ser expresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad. Los ensayos de serodiagnóstico revelaron que la PQ, posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 96% (Soto, Requena et al. 1998).

Estudios posteriores plantearon la posibilidad de probar la capacidad de la PQ como candidato a vacuna frente a LV. Para ello se analizó el potencial inmunogénico de la proteína recombinante. Se demostró que la PQ, al ser inoculada con BCG es capaz de inducir protección en perros tras ser sometidos al reto experimental con *L. infantum* (Molano, Alonso et al. 2003).

Asimismo, se analizaron sus propiedades antigénicas cuando se asocia a diferentes adyuvantes. Los resultados demostraron que cuando la PQ se combina con ODNs con motivos CpG induce un alto grado de protección frente al reto experimental con *L. infantum* en ratones BALB/c (Parody, Soto et al. 2004).

Un estudio reciente permitió demostrar que perros vacunados con una única dosis de PQ, en ausencia de adyuvantes logran montar una fuerte protección frente al reto con *L. infantum*, en comparación con los perros que recibieron dos dosis de la vacuna. Esta protección se correlaciona con un balance en la respuesta humoral y celular que permite la eliminación eficiente del parásito (Carcelen, Iniesta et al. 2009). Estos hallazgos demuestran que la PQ es un buen candidato a vacuna dadas sus excelentes cualidades inmunogénicas.

A la fecha no se tiene datos acerca de la capacidad antigénica y protectora de la PQ frente a LC, causada por *L. major*. Es por ello por lo hemos planteado hacer un seguimiento de la respuesta inmune generada en ratones de alta susceptibilidad tales como BALB/c tras la infección con *L. major* como paso previo y requisito para poder diseñar sistemas protectivos.

1.8. Perspectivas en el desarrollo de vacunas frente a leishmaniasis

Otras aproximaciones para una vacuna contra el parásito han sido estudiadas, es así como un gran número de las vacunas de segunda y tercera generación han sido testadas pero de ellas solamente la LEIHS-F1+MLP-SE previamente conocida como Leish111F, está en fase I de experimentación. Otras tres vacunas, en fase preclínica, están siendo desarrolladas en Europa: (i) la vacuna sintética RAPSODI que podría ser eficaz tanto para las leishmaniasis viscerales como tegumentarias, (ii) una vacuna de ADN basada en un vector viral, desarrollada por Paul Kaye y colaboradores en el Reino Unido y (iii) LEISHADNVAX que utiliza un vector lineal con la nueva tecnología MIDGE –del inglés *minimalistic immunogenetically defined gene*– que permite seleccionar de tres a cinco antígenos protectores e introducirlos dentro del vector el cual puede usarse sólo ó con un adyuvante sintético -*double stem loop immunomodulator*: dSLIM- (Modabber 2010). Un estudio reciente describe, la ca-

pacidad protectora de una nueva molécula; KSAC. Esta proteína multiantigénica compuesta por cuatro antígenos derivados de *L. infantum* (KMP-11, SMT, A2 y CPB), genera protección frente al reto experimental con *L. infantum* y *L. major* en ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente (Goto, Bhatia et al. 2011)

La selección de candidatos a vacunas contra la leishmaniasis continúa. Una gran cantidad de antígenos han sido evaluados hasta la fecha con diversos adyuvantes y la respuesta inmune inducida genera sólo una protección parcial. Se debe precisar entonces si la vacuna debe ser una molécula definida o por el contrario el uso del parásito vivo atenuado permite obtener la mayor protección con total seguridad.

El abanico de posibilidades está abierto y uno de los mayores retos que se plantea en este punto es obtener una vacuna que genere protección contra LC y que esta eficacia pueda ser extrapolada también a LV.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Los notables avances en cuanto al diagnóstico molecular, tratamiento y los datos descritos sobre susceptibilidad o control de la leishmaniasis, han permitido plantear que el diseño de una vacuna es factible.

Se considera que una vacuna con antígenos definidos, es una de las mejores alternativas como método profiláctico para la leishmaniasis. Esto es debido a su facilidad de producción, seguridad, reproducibilidad y bajo costo, entre otras.

La Proteína Q es un modelo de este tipo de vacunas. Posee epítomos B derivados de las proteínas ácidas ribosomales, LiP2a, LiP2b, LiP0 y la histona H2A de *Leishmania infantum*. Varios estudios demostraron que la proteína logra inducir protección tanto en ratones como en perros frente al reto experimental homólogo. Sin embargo, no hay datos que permitan analizar cuál es su comportamiento inmunológico tras la infección causada por *Leishmania major*.

El objetivo central de este trabajo es hacer un seguimiento de la respuesta inmune humoral y celular tras la inoculación de la Proteína Q en el modelo de leishmaniasis cutánea, causada por *L. major*, en ratones susceptibles BALB/c. Dentro de este contexto trataremos de analizar varios temas:

Diseño de diferentes formulaciones de la Proteína Q.

Caracterización de la respuesta inmune humoral desencadenada tras la inoculación de las diferentes formulaciones de la Proteína Q.

Caracterización de la respuesta inmune celular desencadenada tras la inoculación de las diferentes formulaciones de la Proteína Q.

Determinación de las variantes en el repertorio de linfocitos T generado tras la inoculación de la Proteína Q como proteína recombinante y en forma de vacuna de ADN.

Establecer el grado de protección que pudiera ser generado por la inmunización de la Proteína Q.

Determinación de potenciales parámetros asociados con protección o susceptibilidad, a nivel humoral y celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos y soluciones

Los principales reactivos empleados fueron suministrados por Nordic, Roche, Boehringer, Merck, Sigma y Pharmacia, salvo que se indique lo contrario.

Los medios y soluciones más empleados se prepararon siguiendo los protocolos de Maniatis y colaboradores (1982).

Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por Fermentas (Lituania).

Los marcadores de peso molecular de proteínas fueron suministrados por New England Biolabs.

Los marcadores de peso molecular de ADN fago Φ 29 ó fago λ digeridos con *Hind* III fueron suministrados por el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

3.2. Material biológico

3.2.1. Bacterias

Las cepas de *Escherichia coli* que se emplearon para este estudio fueron: XL1Blue y M15.

3.2.2. Parásitos

Se emplearon las siguientes cepas de parásitos:

Leishmania major (cepa WHOM/IR/-173), obtenida por cortesía de la Dra. Rosa M^a Gonzalo (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Leishmania major cepa V1 (MHOM/IL/80/Friedlin), generosamente cedida por el Dr. David Sacks (NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, E.E.U.U.).

3.2.3. Líneas celulares

Se empleó la línea celular de mamífero COS-7 derivadas de riñón de mono, obtenidas por cortesía de Laura Corvo (CBMSO).

3.2.4. Animales de experimentación

Todos los ratones – *Mus musculus* – fueron mantenidos en las instalaciones del animalario del CBMSO.

Se emplearon hembras de 6-8 semanas de edad de la cepa BALB/c las cuales fueron suministradas por Harlan Interfauna Ibérica S.A.

3.3. Oligodeoxinucleótidos con motivos CpG

Como adyuvantes, se emplearon dos ODNs con motivos CpG que contienen uniones de tipo fosforotioato. Estos ODNs fueron sintetizados por Isogen (Países Bajos) y sus secuencias son:

A: 5' -TCAACGTTGA-3' y **B:** 5'-GCTAGCGTTAGCGT-3'.

3.4. Medios y condiciones de cultivo

3.4.1. Medio LB (Luria-Bertani)

Las bacterias *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LB (1% p/v triptona, 0,5% NaCl p/v, 0,5% p/v de extracto de levadura), suplementado o no con el correspondiente antibiótico de selección: ampicilina (50 µg/ml) y/o kanamicina (25 µg/ml). Para crecer las bacterias en medio sólido se añadió agar al 15% (P/V) al medio LB.

3.4.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

El medio (RPMI-1640, Gibco BRL) fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FCS), 0,1 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina. Este medio fue empleado para el crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* realizado a 26°C. Los cultivos se iniciaron con una densidad de 10⁶ células/ml. Los cultivos utilizados en fase logarítmica (5-9 × 10⁶ cel/ml) se recolectaron tras 2-3 días de crecimiento, mientras que los utilizados en fase estacionaria (1,5-2 × 10⁷ cel/ml) se tomaron a los 5-7 días de crecimiento.

3.4.3. Medio Schneider's

El medio Schneider's (preparado por Alfonso Gutiérrez, del servicio de cultivos del CBMSO) fue suplementado con 20% (v/v) de FCS, 0.1 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina. Se empleó en la diferenciación de amastigotes a promastigotes para la cuantificación de parásitos mediante la técnica de dilución límite y para la preparación de promastigotes infectivos.

3.4.4. Medio "RPMI completo"

Empleado en los cultivos primarios de linfocitos de bazo y de ganglio linfático, consiste en medio RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con 10% v/v FCS, 2 mM L-glutamina, 0,44 mM L-alanina, 0,4 mM L-asparagina, 0,343 mM L-glutamato, 0,1 mg/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina, 50 µg/ml gentamicina, 10 µM β-mercaptoetanol.

3.4.5. Medio DMEM Completo

El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) fue suplementado con 5% v/v FCS, 2mM L-glutamina, 0,1 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina. Se empleó en el mantenimiento y transfección de la línea celular COS-7.

3.5. Purificación de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron siguiendo el método de lisis alcalina. En el caso en los que se precisó de una alta cantidad de plásmido (0,5 a 10 mg) se empleó el kit comercial de Giga-prep y Endo-free™ (Qiagen).

3.5.1. Preparación de células competentes y transformación

El método seguido para la generación de competentes fue el del cloruro de calcio. Bacterias cultivadas durante una noche se diluyeron 50 veces y se cultivaron hasta obtener una densidad óptica a 590 nm de 0,5-0,6. El cultivo se centrifugó 15 min, a 4.000 g y 4°C y el sedimento se resuspendió en CaCl₂ 50 mM, dejándose en hielo durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó de nuevo en las

mismas condiciones y se resuspendió en CaCl_2 50 mM, se hicieron alícuotas y se glicerolizó al 15%. Cada alícuota de células competentes contiene un número de células equivalente a 1 ml de cultivo con una $\text{D.O.}_{590\text{nm}}$ de 0,5-0,6. Las células competentes se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

La transformación de las bacterias se realizó por un procedimiento de choque térmico. Tras la adición del ADN a las células competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 40 minutos agitando suavemente cada 5 minutos. A continuación se dio un choque térmico de 2 min a 42°C . Posteriormente se añadieron 0,7 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante una hora, sin adición de ningún antibiótico. Pasado ese tiempo se sembró en placa con medio LB con el antibiótico adecuado y se incubó toda la noche a 37°C para el crecimiento de las colonias.

3.6. Purificación de proteínas recombinantes

3.6.1. Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a cadenas de histidinas (6x His-tagged proteins, vector pQE) mediante cromatografía de afinidad

Se emplearon cultivos bacterianos transformados con distintas construcciones en el plásmido pQE30. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de 2 mM IPTG durante 4 horas a 37°C . Se realizaron dos tipos de purificaciones: en condiciones nativas o en condiciones desnaturizantes.

Purificación en condiciones desnaturizantes

La Proteína Q se obtuvo por purificación en condiciones desnaturizantes en gradiente de pH. Tras la inducción, el cultivo bacteriano fue centrifugado (4.000 g) y el sedimento obtenido fue lisado por sonicación en condiciones desnaturizantes (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). El sobrenadante se cargó sobre la columna de nitriloacético- Ni^{2+} (NINTA, Quiagen), luego se realizaron lavados consecutivos con el mismo tampón y la Proteína Q se eluyó de la columna por reducción paulatina de pH en tampón de elución (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 4,5). La proteína fue dializada en tampón borato (150 mM NaCl, 50 mM $\text{B}(\text{OH})_3$, pH 9,4) toda la noche a 4°C .

Las proteínas recombinantes LiP0 y H2A se purificaron en condiciones desnaturizantes en gradiente de urea. Para ello, después de la inducción el cultivo bacteriano fue centrifugado (4000 g) y el sedimento, se lisó por sonicación en condiciones desnaturizantes (8 M urea, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Se llevó a cabo una nueva centrifugación, descartándose el sedimento y el sobrenadante se cargó sobre columnas de nitrilotriacético- Ni^{2+} agarosa (NINTA, Qiagen) que poseen afinidad por el grupo imidazol del aminoácido histidina. Posteriormente se realizaron lavados y la proteína recombinante fue paulatinamente renaturalizada en la columna, pasando a través de la columna un gradiente continuo de urea de 8M (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) a 0 M (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, 1mM β -mercaptoetanol, pH 8,0) siguiendo la metodología en Shi y colaboradores (Shi, Maizels et al. 1997). Finalmente la elución de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante la adición de imidazol 0,3 M (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,3 M imidazol, 3 mM β -mercaptoetanol, pH 8,0).

Purificación en condiciones nativas

Las proteínas recombinantes rLiP2a y rLiP2b fueron obtenidas en condiciones nativas. Para ello, los extractos bacterianos fueron lisados por sucesivos ciclos de congelación y descongelación, tras los cuales se llevó a cabo una sonicación en un tampón sin urea (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0). Posteriormente el lisado es cargado en una columna de nitrilotriacético- Ni^{2+} agarosa (NINTA, Qiagen) y tras diversos lavados, con el tampón antes mencionado, la elución se llevó a cabo mediante una paulatina reducción de pH en tampón que contiene un 10% de glicerol (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 10% pH 4,5).

La diálisis de las proteínas LiP2a, LiP2b, LiP0 y LiH2A se realizó en tampón PBS 0.1X, toda la noche a 4°C. Todas las proteínas recombinantes purificadas se hicieron pasar por una columna de Agarosa-Polimixina B (Sigma), para eliminar las endotoxinas presentes. Posteriormente se concentraron por filtración utilizando filtros Vivaspín 20 (Sartorius Stedim, Alemania).

3.7. Electroforesis y cuantificación de proteínas

El estado de las proteínas purificadas se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), empleando el sistema Mini-Protean II de BioRad. Para ello las proteínas se desnaturalizan en tampón Laemmli (Laemmli 1970) calentando durante 5 minutos a 95°C.

La separación va a tener lugar en función del tamaño de las proteínas analizadas. La visualización de las mismas se lleva a cabo por tinción con azul de Coomassie (Pallas, Schley et al. 1986). La cuantificación de proteínas se realizó empleando el método de Bradford (Bradford 1976) usando como reactivo el que suministra BioRad (Coomassie G-20 en ácido fosfórico y metanol) y por espectrofotometría midiendo absorbancia a 450 nm.

3.8. Transfección *in vitro* de células COS-7

La transfección de las células COS-7 se realizó para confirmar que la construcción del gen de la proteína Q de *Leishmania* en pcDNA3 se expresa en células de mamífero. Se cultivaron 3×10^6 células COS7 en placas de 100 mm de diámetro en medio DMEM suplementado con 5% de FCS. La transfección se llevó a cabo cuando las células alcanzaron el 75% de confluencia.

La transfección se realizó por electroporación. Para ello las células se lavan y se resuspenden en 200 μl de DMEM (10% FCS, HEPES 10 mM). Las células se disponen en una cubeta de electroporación de 4 mm (BioRad) y se añaden 5 μg de la construcción en pcDNA3 y 100 μg de ADN de salmón. La electroporación se realiza mediante un pulso de 200 V a 960 mF, durante 40-50 ms. Posteriormente las células se resuspenden en 10 ml de DMEM completo en placas de 100 mm. Transcurridas 72 horas de la transfección, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas directamente en tampón Laemmli para usarlas en SDS-PAGE y Western-blot.

3.9. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó en células adherentes COS-7 transfectadas con pcDNA3Q y pcDNA3, este último se usó como control. Se tomó 1 ml de las células transfectadas y se cultivaron en DMEM sobre un cubre objetos en placas de 24 pocillos. Transcurridas 24 h, se realizan dos lavados

con PBS y las células son fijadas con paraformaldehído (4% en PBS) durante 10 min a 4°C. Posteriormente se realizan dos lavados y se lleva a cabo la eliminación de la autofluorescencia mediante la incubación con NaBH₄ (1mg/ml en PBS pH 8,0) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realiza durante 10 minutos (BSA 1%, Triton 100X 0,1% en PBS), a continuación se incuban los cubre objetos con el anticuerpo primario (suero de ratón inmunizado con la Proteína Q en dilución 1:200) durante 1 hora. Después, se llevan a cabo tres lavados con PBS y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario (1:500) conjugado con Alexa488 (Donkey anti-mouse, Molecular Probes) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último se realizan tres lavados y se montan las preparaciones con Mowiol (Calbiochem). Tras el secado de las muestras, la detección de la fluorescencia se llevó a cabo empleando un microscopio invertido Axiovert 200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd (monocromo/color) del Servicio de Microscopía Óptica y confocal del CBMSO.

3.10. Pautas de inmunización y obtención de sueros

Grupos de seis animales se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha. Se administraron dos dosis espaciadas 15 días. Se inocularon nueve grupos de acuerdo a la tabla que se muestra a continuación (Tabla 3.1).

Nombre del Grupo	Concentración antígeno	CpGs A y B	Vol. final inóculo
Q	10 µg	-	30 µl
Q+CpG (QCpG)	10 µg	25 µg de c/u	30 µl
pcDNA3Q	75 µg	-	42 µl
"Prime boost"+Q (pcDNA3Q+Q)	I dosis 75 µg	-	42 µl
	II dosis 10 µg	-	30 µl
"Prime boost"+Q+CpG (pcDNA3Q+QCpG)	I dosis 75 µg	-	42 µl
	II dosis 10 µg	25 µg de c/u	30 µl
Salino	-	-	30 µl
CpGs	-	25 µg de c/u	30 µl
pcDNA3	75 µg	-	30 µl
"Prime boost"+CpGs (pcDNA3+CpGs)	I dosis 75 µg	-	42 µl
	-	II dosis 25 µg de c/u	30 µl

Tabla 3.1. Grupos de animales inmunizados y grupos control empleados en el estudio.

Antes de cada inoculación y 15 días después de cada una de ellas se tomaron muestras de sangre, así como un día antes del sacrificio. El suero se obtuvo centrifugando la sangre extraída durante 15 min a 12.000 g, se glicerolizó en una proporción 1:1 y fue almacenado a -20°C.

3.11. Infecciones experimentales

Los parásitos infectivos se obtuvieron de homogenados de ganglio poplíteo de ratones infectados con *L. major* en medio Schneider's. Los macerados se mantuvieron a 26°C, dando lugar a la dife-

renciación de la forma promastigote tras 5-7 días de cultivo.

Se establecieron cultivos con dichos promastigotes y posteriormente los parásitos se congelaron en nitrógeno líquido en FCS (90%) y DMSO (10%).

3.11.1. Infección en la almohadilla plantar de ratones BALB/c

Las infecciones con *L. major* en ratones susceptibles BALB/c se llevaron a cabo mediante inoculación de 5×10^4 promastigotes en fase estacionaria, en 30 μ l de PBS, de forma s.c. en la almohadilla plantar de la pata trasera izquierda.

3.12. Medida de las lesiones cutáneas en los ratones infectados con *L. major*

La inflamación de la almohadilla plantar, provocada por la infección con *L. major* en los ratones BALB/c, se determinó semanalmente con un calibre digital. Los datos se expresan en milímetros y se corresponden a la diferencia entre la medida de la almohadilla infectada y la no infectada.

3.13. Estimación de la carga parasitaria

Para estimar la cantidad de parásitos en un tejido concreto (ganglio o bazo) se empleó el método de la dilución el límite descrito por Buffet y colaboradores (Buffet, Sulahian et al. 1995) que permite detectar hasta 2 parásitos por mg de tejido. El tejido a analizar se homogenizó en medio Schneider's utilizando un tamiz estéril. Se emplearon placas de 96 pocillos (Nunc, Tokio, Japón) y se llevaron a cabo diluciones 1:3 en un volumen total de 225 μ l por pocillo. Las placas se incubaron a 26°C y se determinó la presencia de promastigotes móviles en los distintos pocillos. El título final corresponde a la última dilución en la que se observó al menos un promastigote. El número total de parásitos **A** se calcularía: $A = (\text{factor de dilución})^{(\text{último pocillo} - 1)}$.

3.14. Obtención de cultivos primarios de bazo y ganglio linfáticos

Los bazos y ganglios linfáticos se obtuvieron en condiciones asépticas y se homogenizaron preparando una suspensión celular en medio RPMI completo empleando un tamiz comercial de 70 μ m (Becton Dickinson, Falcon). Tras un lavado, las células de bazo, se resuspendieron en un tampón adecuado para lisar eritrocitos (150 mM NH_4Cl , CO_3HK , 1mM EDTA pH 7,4) manteniéndose a 37°C por dos minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con medio RPMI completo y la concentración celular se determinó mediante conteo en la cámara de Neubauer. Los cultivos se mantuvieron en RPMI completo a 37°C en un incubador humidificado en presencia de un 5% de CO_2 .

3.14.1. Condiciones de estimulación para la determinación de citoquinas

Las células de bazo y ganglio se emplearon a una concentración de 5×10^6 células/ml. La estimulación se llevó a cabo en placas de cultivo de 24 celdas (Nunc), dispensando 1 ml por pocillo; o en placas de 48 celdas, dispensando 0,7 ml por pocillo. Los estímulos, salvo que se indique lo contrario, se emplearon a las siguientes concentraciones: proteína Q (10 μ g/ml), antígenos recombinantes de *Leishmania* (12 μ g /ml), proteína total del parásito (24 μ g /ml) y Concanavalina A (Sigma) a 1 μ g /ml.

3.15. Ensayos de ELISA

3.15.1. Ensayo de ELISA convencional

La medida de la reactividad de los diversos sueros frente a las diferentes proteínas, así como la determinación de los títulos de anticuerpos e isotipos, se cuantificó por ELISA –del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* -.

Para el ensayo se emplean las placas de 96 pocillos (Nunc), que fueron saturadas durante toda la noche a 4°C con una solución de antígeno en PBS (2 µg de proteína por ml de PBS).

A continuación las placas son secuencialmente incubadas durante un mínimo de dos horas con 200 µl/ pocillo en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% y Tween 20 al 0,5% en PBS); durante un mínimo de dos horas con 100 µl/pocillo usando los sueros en solución de bloqueo a una dilución 1:200; durante un mínimo de una hora con 100 µl/pocillo añadiendo el segundo anticuerpo correspondiente conjugado con peroxidasa a la dilución indicada en cada caso. Todas estas incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente con agitación suave.

Entre cada una de las diferentes incubaciones se realizan tres lavados con una solución de PBS al 0,5% de Tween 20.

Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anti-IgM de ratón a una dilución de 1:2000 en solución de bloqueo; anti-IgG de ratón a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo; anti-IgG1 de ratón a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo; anti-IgG2a de ratón a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Todos ellos fueron suministrados por Nordic Immunological Laboratorios (Tilburg, Países Bajos). El revelado se lleva a cabo usando 100µl/pocillo de ortofenilenediamina (OPD) como sustrato de la peroxidasa. La reacción se detiene mediante la adición de 50 µl por pocillo de H₂SO₄ 0,25M. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector microplate reader 680 (Bio-Rad, Reino Unido).

3.15.2. Ensayo de ELISA para la determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos

La cuantificación de citoquinas (IFN-γ, IL-4 e IL-10) se llevó a cabo mediante kits basados en la técnica de “Sandwich-ELISA” de las siguientes casas comerciales: Diaclone y eBiosciences. Se emplearon placas de ELISA de poliestireno de alta afinidad COSTAR® (Corning, NY, E.E.U.U.), sobre las que se dispensó el anticuerpo de captura siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras los lavados y el pertinente bloqueo (BSA 5% p/v en PBS), se añadieron las muestras y se elaboró una recta patrón con la citoquina correspondiente. Posteriormente se empleó un anticuerpo biotinilado, y tras varios lavados, se añadió la enzima peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (HRP-estreptavidina). Como sustrato de la reacción se empleó TMB. La reacción se detiene mediante la adición de 50 µl por pocillo de H₂SO₄ 0,25M. La absorbancia se midió a 450nm en un lector microplate reader 680 (Bio-Rad, Reino Unido).

3.16. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de células de bazo y ganglio previamente estimuladas. Para tal fin se centrifugaron las placas de los cultivos, se recuperó el sobrenadante conservándolo

para un uso posterior y las células (un promedio de 3×10^6) se lisaron con 1 ml del reactivo de TRIzol® (Invitrogen). El homogenado fue incubado durante 10 minutos en hielo, posteriormente se añadió 0,2 ml de cloroformo, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron en hielo 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 12.000 g. El sobrenadante es recuperado y el ARN se precipitó añadiendo 0,5 ml de isopropanol, las muestras fueron incubadas 30 minutos en hielo y luego centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 12.000 g. A continuación el ARN se lavó con etanol al 75%, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores; el sobrenadante se descartó y el sedimento, se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en agua RNase-free (Invitrogen) y se conservó a -70°C, hasta el momento de su uso.

La pureza y concentración del ARN se evaluó por medio de espectrofotometría en Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific). En todos los casos las relaciones 260/280 y 260/230 fueron superiores a 1,8 y 2,0 respectivamente. La integridad del ARN se comprobó mediante el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies), observándose valores de RIN –del inglés *RNA integrity number*– superiores a 7.

3.17. Síntesis de ADNc

La reacción de transcriptasa reversa se realizó utilizando el kit High capacity DNAc Archive de Applied Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante; en el equipo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

3.18. Cuantificación de la expresión de los genes para citoquinas por PCR en tiempo real

La cuantificación de los genes involucrados en la respuesta inmune; IL-2, IL-4, IL-10, IL-12a, IL-13, iONS, INF- γ , TGF- β y TNF- α , se realizó usando sondas TaqMan (Applied Biosystems) en el equipo ABI PRIMS 7900 HT (Applied Biosystems) en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid. El análisis de la expresión de los genes se realizó utilizando la fórmula de $2^{\Delta\Delta C_T}$ (Pfaffl 2001), donde se compara el ciclo umbral de expresión de las muestras (C_T) con respecto al basal, usando como referencia el gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados son expresados en términos de expresión relativa, respecto a la muestra control.

3.19. Análisis del repertorio TCRV β por medio de la determinación del tamaño del CDR3

El análisis de los cambios en la diversidad del repertorio de las células T inducidos tras las inoculaciones y posteriores infecciones se llevó a cabo por medio de la metodología descrita por Pannetier y colaboradores (Pannetier, Cochet et al. 1993) con algunas modificaciones. El ADNc se amplifica con cada uno de los oligonucleótidos específicos para las 24 familias del segmento variable β del TCR y un oligonucleótido marcado con el fluorocromo 6-FAM™ (6-Carboxifluoresceína) que hibrida en la región constante de la región V β (Tabla 3.2). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 35 ciclos de 95°C 30'' - 60°C 30'' - 72°C 90'' y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fluoromarcados son diluidos y corridos en un

secuenciador automático ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). El análisis inicial con el software Peak Scanner™ (Applied Biosystems) muestra un gráfico con los picos de cada espectratipo y además permite calcular el tamaño en pares de bases y el área de cada pico. El espectratipo representa la intensidad de fluorescencia en relación al tamaño en pares de bases (Figura 3.1). Cada pico observado corresponde con una población de CDR3 con una longitud determinada. En el caso del estudio de poblaciones de TCR en ratón, se observan aproximadamente 9 picos por familia, es decir que el número de mediciones realizadas para cada animal, es de 216. En el presente trabajo se analizaron los perfiles de TCR para 16 animales, el análisis inicial de los 384 espectratipos se hace complejo por comparación visual. Por esta razón se realiza una segunda evaluación cuantitativa de los datos con el software ISEApeaks® (Collette, Cazenave et al. 2003), el cual permite transformar los espectratipos obtenidos en frecuencias de distribución cuyos valores son expresados como la razón entre el área de un pico determinado y el área total del perfil del espectratipo (Figura 3.2, panel A). Una vez obtenidos los valores de frecuencia del grupo problema (Df1) y del grupo control (Df2), se calcula la diferencia entre los valores de ambas frecuencias para cada longitud de CDR3 $(Df1-Df2)=D$. El valor de la perturbación es calculado mediante aproximación matemática HD –del inglés *Hamming Distance*–, usando la fórmula $HD=100[DP/2]$, donde DP es la suma de los valores absolutos de las diferencias entre dos distribuciones (Figura 3.2, panel B). De esta forma, se considera que los perfiles cuyos valores de perturbación sean iguales a cero son idénticos al control, mientras que valores cercanos o iguales al 100% son totalmente diferentes. En la práctica, réplicas de la misma muestra, realizadas en paralelo pueden producir valores de perturbación en un rango entre 2% y 5% (Currier and Robinson 2001). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, permitieron determinar que los perfiles con valores de perturbación superiores al 15% presentan cambios significativos con respecto al control y suelen ser considerados de interés dentro del análisis. Con estos valores, se determinan las modificaciones en el TCR generadas tras la estimulación con la PQ en células de animales vacunados e infectados.

Nombre Oligo	Secuencia	Tamaño (pb) para 10 aa.
Vβ1	CTGAATGCCAGACAGCTCCAAGC	172
Vβ2	TCACTGATACGGAGCTGAGGC	163
Vβ3.1	CCTTGCAGCCTAGAAATTCATG	152
Vβ4	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC	190
Vβ5.1	CATTATGATAAAATGGAGAGAGAT	224
Vβ5.2	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC	215
Vβ5.3	AGAAAGGAAACCTGCCTGGTT	202
Vβ6	CTCTCACTGTGACATCTGCCC	144
Vβ7	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC	179
Vβ8.1	GGCTGATCCATTACTCATATGTC	238
Vβ8.2	TCATATGGTGCTGGCAGCACTG	226
Vβ8.3	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA	215
Vβ9	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC	145
Vβ10	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA	136
Vβ11	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAGC	154
Vβ12	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC	203
Vβ13	AGGCCTAAAGGAACTAACTCCACT	168
Vβ14	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC	157
Vβ15	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC	176
Vβ16	CACTCTGAAAATCCAACCCAC	147
Vβ17	AGTGTTCTCGAACTCACAG	173
Vβ18	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC	171
Vβ19	CTGCTAAGAAACCATGTACCA	163
Vβ20	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA	153
Cβ	6FAM-CTTGGGTGGAGTCACATTTCTC	

Tabla 3.2. Resumen de las secuencias de los 24 oligonucleótidos que amplifican para las familias de la región Vβ del TCR y el oligonucleótido constante.

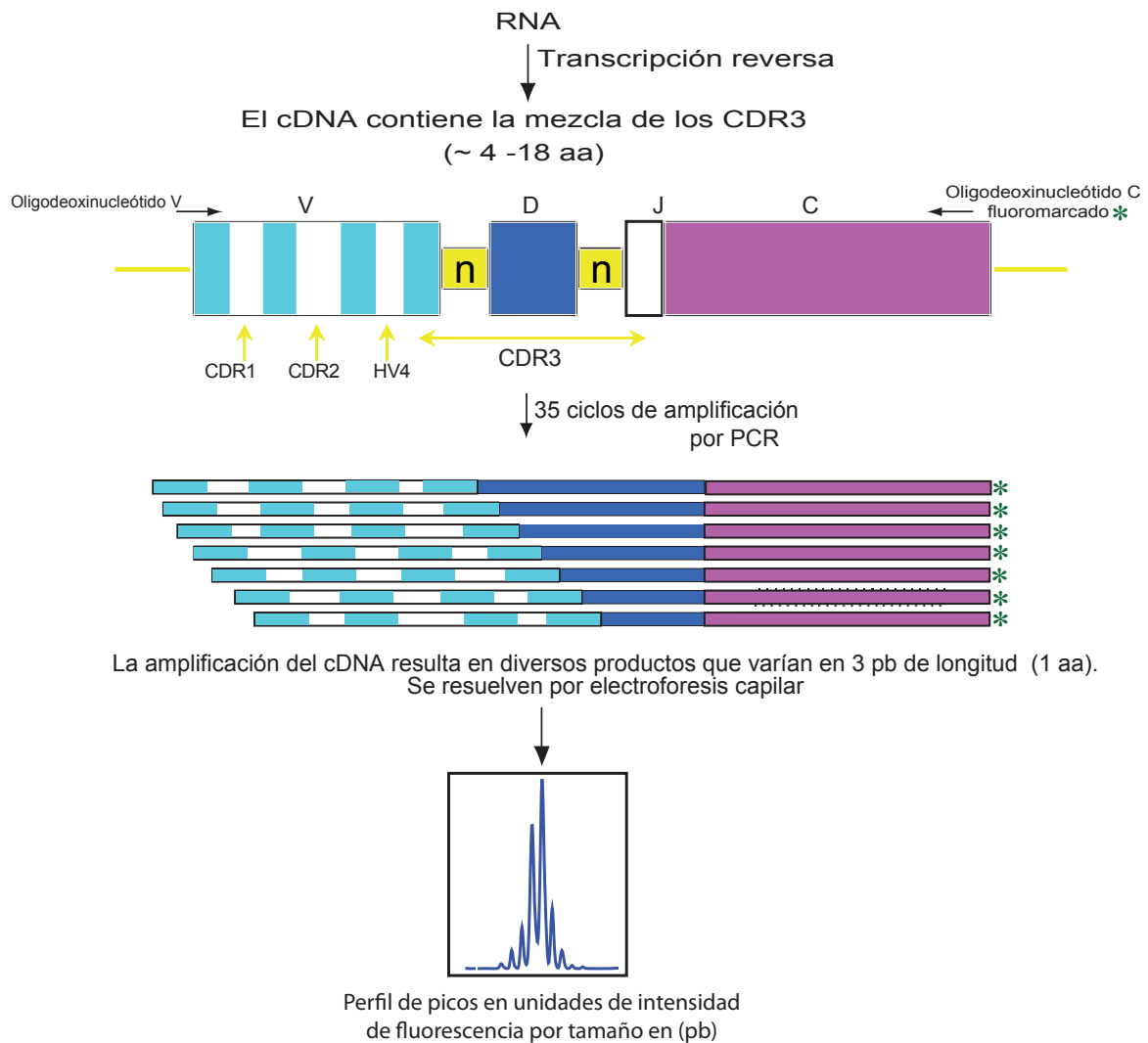


Figura 3.1. Expresión del repertorio TCR. Se muestra un diagrama esquemático de la región que codifica para los genes TCR β . Las cadenas TCR β están formadas por la unión de los rearrreglos en la línea germinal de los genes V, D, J y C. En las regiones de unión V-D y D-J pueden ser insertados o eliminados n nucleótidos de forma aleatoria. El análisis de la diversidad del TCR involucra la amplificación de los transcritos para el TCR con oligonucleótidos 5' específicos para las 24 familias V β y un oligonucleótido 3' (6-FAM) de la región constante del TCR. Los productos de PCR amplificados y fluoromarcados son resueltos y detectados en un secuenciador automático. El resultado es un espectratipo que representa los picos en unidades de intensidad de fluorescencia por tamaño en pares de bases.

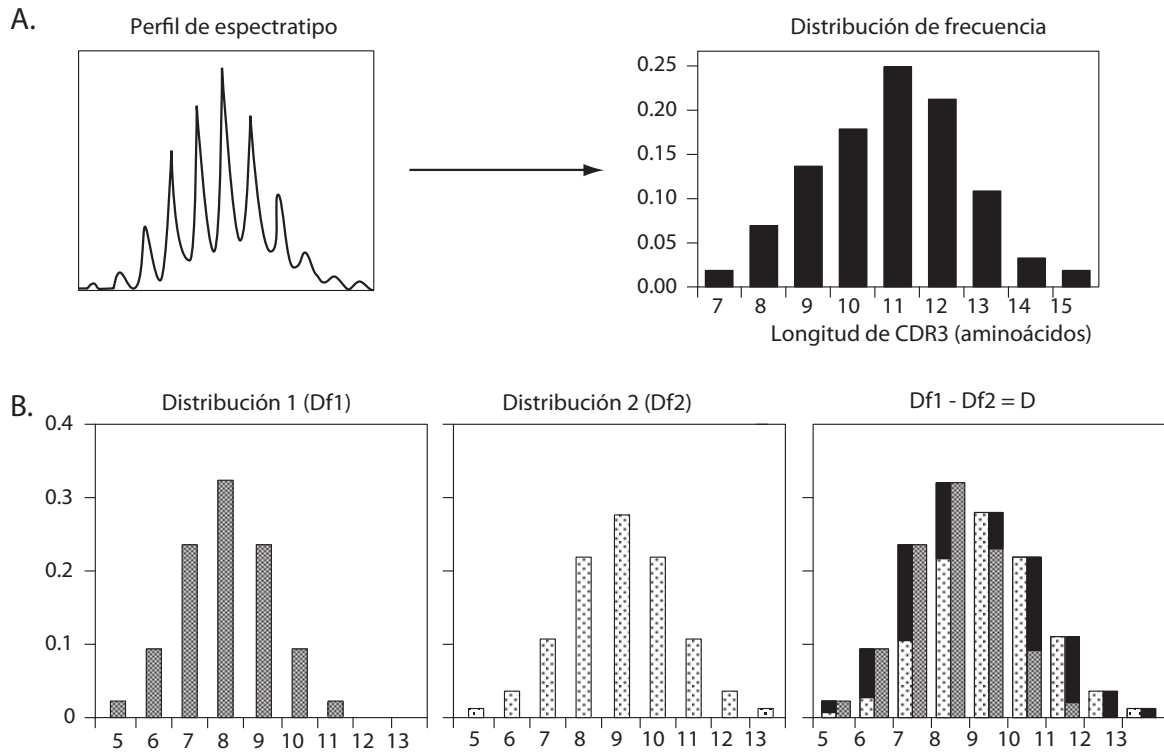


Figura 3.2. Análisis de Espectratipos para cada familia de TCR. En el gráfico se resumen los pasos a seguir para el análisis cuantitativo de los datos generados en un perfil de espectratipos.

A. El área bajo la curva de cada pico es dividida por entre el área total de cada espectratipo para obtener los datos de distribución de frecuencia (Df).

B. La perturbación es calculada mediante la diferencia de: $Df1 - Df2 = D$. En el gráfico corresponde a las barras negras. El porcentaje de perturbación total para cada familia es calculado con la fórmula: $HD = 100 [DP/2]$. Donde DP es la suma de los valores absolutos de las diferencias entre dos distribuciones.

3.20. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, E.E.U.U.). En primer lugar se hizo una prueba de normalidad y de homogeneidad de varianzas. En caso de cumplirse los requisitos necesarios, se procedió a realizar un análisis de varianza multifactorial seguido de pruebas *post-hoc* SNK.

En los casos en los que no se cumplieron las condiciones de homogeneidad de varianza y/o normalidad, los análisis se hicieron utilizando estadística no paramétrica, concretamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de pruebas *post-hoc* U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Obtención de la Proteína Q y los antígenos LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0 como antígenos recombinantes

A partir de la construcción realizada por Soto y cols (Soto, Requena et al. 1998) sobre el vector pQE-30, se realizó la inducción de cultivos bacterianos que permitieron la expresión de la Proteína Q unida a una cadena de 6 histidinas. La purificación se realizó de acuerdo a los protocolos descritos en materiales y métodos. En la figura 4.1 se muestra un gel de SDS-PAGE que corresponde al proceso de purificación por cromatografía de afinidad.

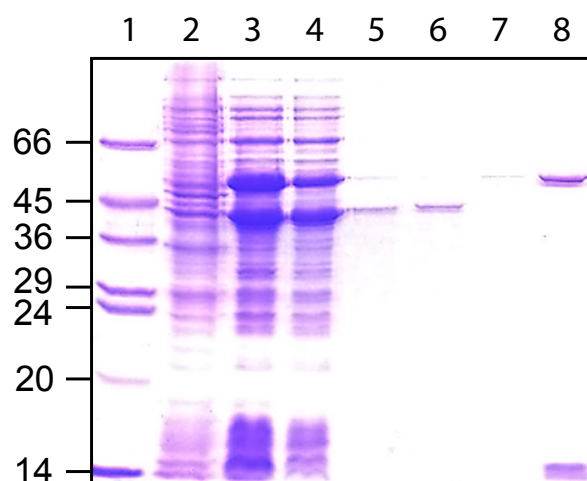


Figura 4.1. Purificación de la proteína Q. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la Proteína recombinante Q. 1. Marcador de peso molecular; 2. Cultivo sin inducir; 3. Cultivo inducido; 4. No unido a la columna; 5-7 lavados; 8. Proteína Q purificada

Los antígenos recombinantes que conforman la Proteína Q –LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0- fueron obtenidos a partir de cultivos bacterianos de los clones pQE30-LiH2A (Iborra, Soto et al. 2004), pQE30-LiP2b y pQE30-LiP2a (Iborra, Abanades et al. 2007) y pQE30-LiP0 (Iborra, Carrion et al. 2005). La inducción, expresión y purificación de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo a lo referido en materiales y métodos.

4.2. Expresión de la Proteína Q como vacuna de ADN

La expresión de la Proteína Q en el vector eucariota se evaluó por medio de transfecciones transitorias sobre células COS-7 con un vector de expresión eucariota que expresa la región codificante para la Proteína Q: pcDNA3Q (Parody 2004). Como control negativo del ensayo se utilizaron células transfetadas con el vector pcDNA3. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre las células trascurridas 72 horas de la transfección. Como se observa en la figura 4.2. (Panel A) las células transfetadas con el vector pcDNA3 no presentan ningún tipo de reconocimiento. Por el contrario, las células transfetadas con el vector pcDNA3Q, presentan una señal intensa en el citosol de las mismas (Panel B), lo que permite confirmar la expresión de la Proteína Q.

Asimismo se quiso evaluar la integridad de la Proteína Q. Para ello se realizó un SDS-PAGE con

el lisado de las células COS-7, células COS-7 transfectadas con pcDNA3 y pcDNA3Q (Panel C) y posterior ensayo de “western blot”. Como se observa en la figura 4.2 (panel D), la Proteína Q es reconocida, por un anticuerpo específico contra la Q, como una única molécula con un peso molecular aproximado de 32 kDa.

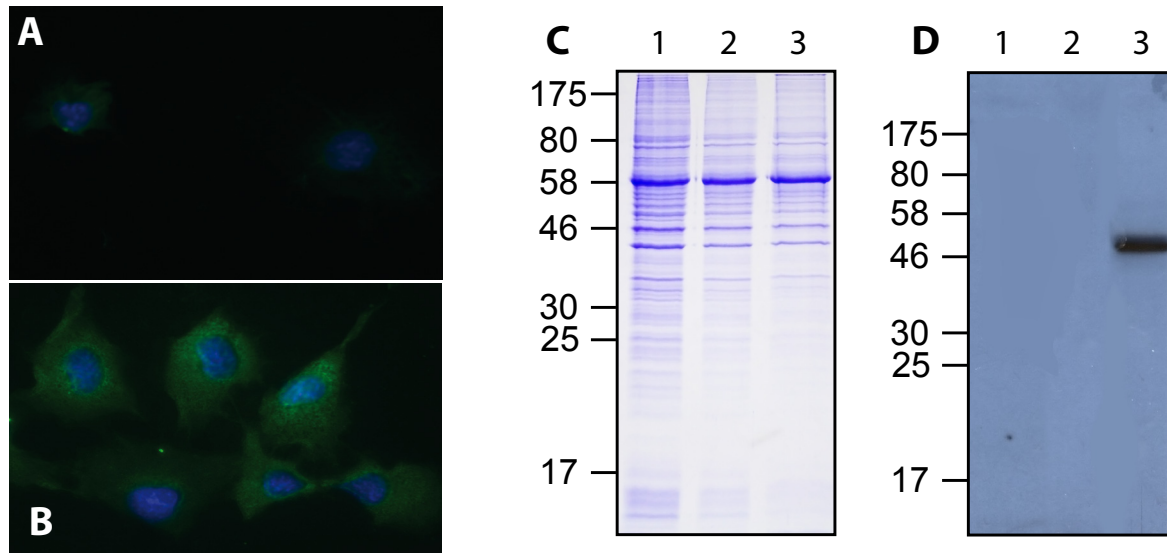


Figura 4.2. Expresión de la Proteína Q en células COS-7. Se realizó inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas mediante electroporación con el vector pcDNA3 (panel A) y pcDNA3Q (panel B). Las células fueron permeabilizadas e incubadas con suero de ratón inoculado con la Proteína Q recombinante. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa-488. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI. SDS-PAGE (panel C) y posterior “western blot” (panel D) con los lisados de las células COS-7 (carril 1); COS-7 transfectadas con pcDNA3 (carril 2) y COS-7 transfectadas con pcDNA3Q (carril 3).

4.3. Evaluación de la respuesta inmune generada tras la inoculación de la Proteína Q en el modelo BALB/c.

4.3.1. Respuesta inmune humoral

Se ha descrito anteriormente que la Proteína Q es una molécula fuertemente inmunogénica capaz de generar una respuesta inmune duradera. Sin embargo, la calidad de la respuesta puede variar dependiendo de las formulaciones en que se use la molécula (Parody, Soto et al. 2004). Teniendo en cuenta esto, cinco formulaciones diferentes se emplearon para inmunizar ratones BALB/c, los cuales fueron sangrados previa inmunización y después de cada una de las dos inmunizaciones. Los sueros obtenidos se utilizaron para medir los valores de IgM e IgG frente a la Proteína Q. Como era de esperar, los sueros correspondientes al sangrado preinmune no presentaron reactividad.

Respuesta de anticuerpos tipo IgM e IgG frente a las diferentes formulaciones de la Proteína Q.

Después de la primera inmunización se pudo determinar que las formulaciones Q y QCpG inducen una respuesta de tipo primario que se relaciona con la presencia de anticuerpos de tipo IgM (Figura 4.3).

Una respuesta de tipo secundario, se observa para la formulación QCpG donde se aprecian anticuerpos de tipo IgG específicos para la Q desde la primera dosis.

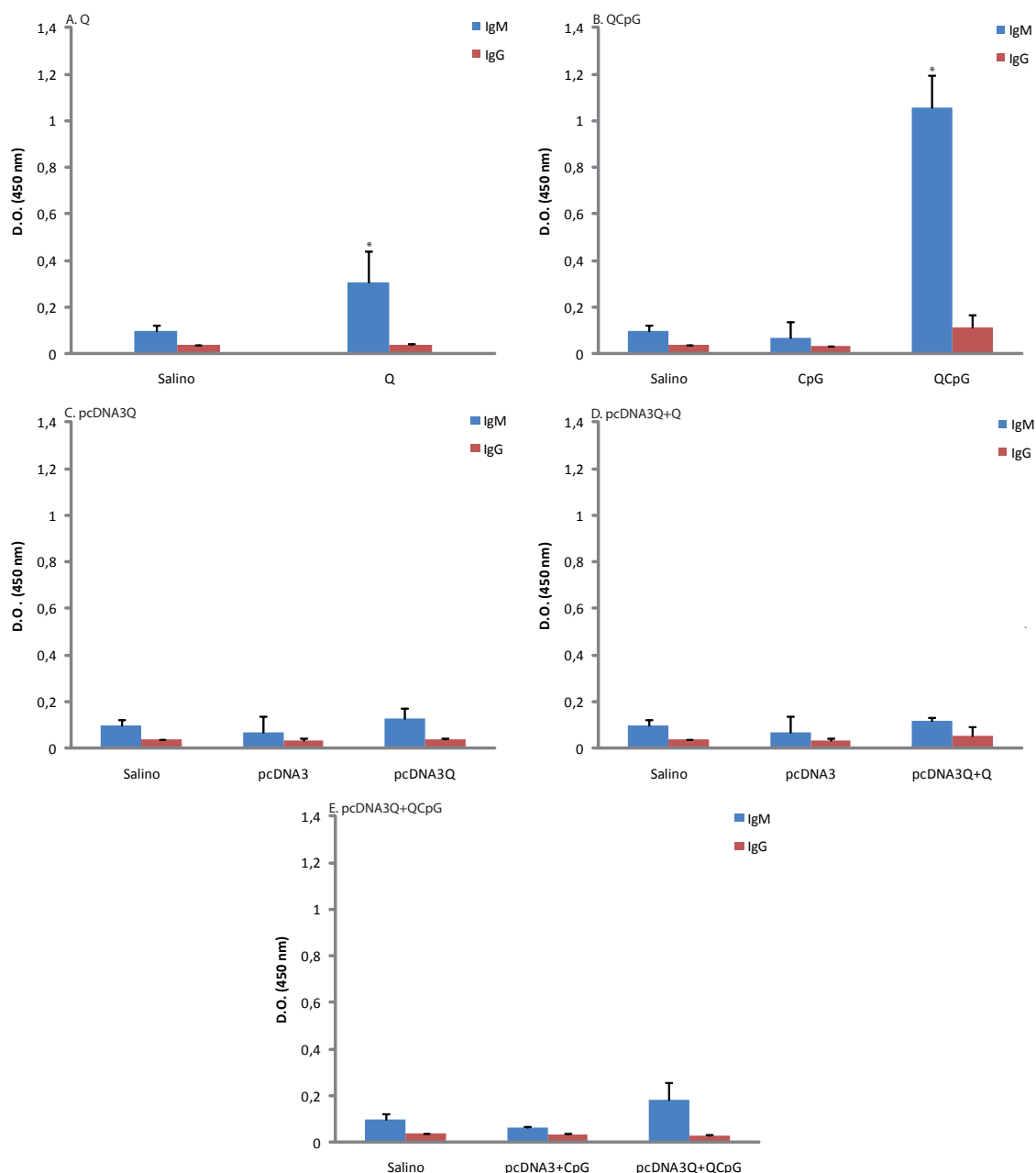


Figura 4.3. Análisis de la respuesta inmune humoral específica para Q en ratones BALB/c. La respuesta de los anticuerpos tipo IgM e IgG fue probada frente a la Proteína Q, quince días después de la primera dosis por medio de ensayos de ELISA. Los sueros de los grupos inmunizados y sus respectivos controles fueron testados en una dilución 1:200. Panel A: formulación Q; panel B: formulación QCpG; Panel C: formulación pcDNA3Q; Panel D: formulación pcDNA3Q+Q y Panel E: formulación pcDNA3Q+QCpG. * Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de IgM para cada formulación con su(s) respectivo(s) control(es) ($p < 0,05$).

Estos datos demuestran que la inmunogenicidad de la Q es mayor al ser inoculada como proteína recombinante que como pcDNA3Q. Además, la formulación que contiene el adyuvante CpG induce una mayor reactividad indicando que el adyuvante aumenta la capacidad inmunogénica de la Proteína Q.

Tras la segunda inoculación se aprecia un aumento en los valores de IgM para todos los grupos inmunizados (Figura 4.4), respecto a los obtenidos después de la primera dosis.

Los niveles de IgG presentaron un aumento significativo en todos los grupos de ratones inmunizados si se comparan con los de la primera inmunización. Entre ellos destaca la formulación QCpG que presenta los niveles más altos del anticuerpo (Figura 4.4, panel B). Este dato confirma que si se administra la PQ recombinante adyuvada con CpG, desde la primera dosis, se logra aumentar su capacidad inmunogénica.

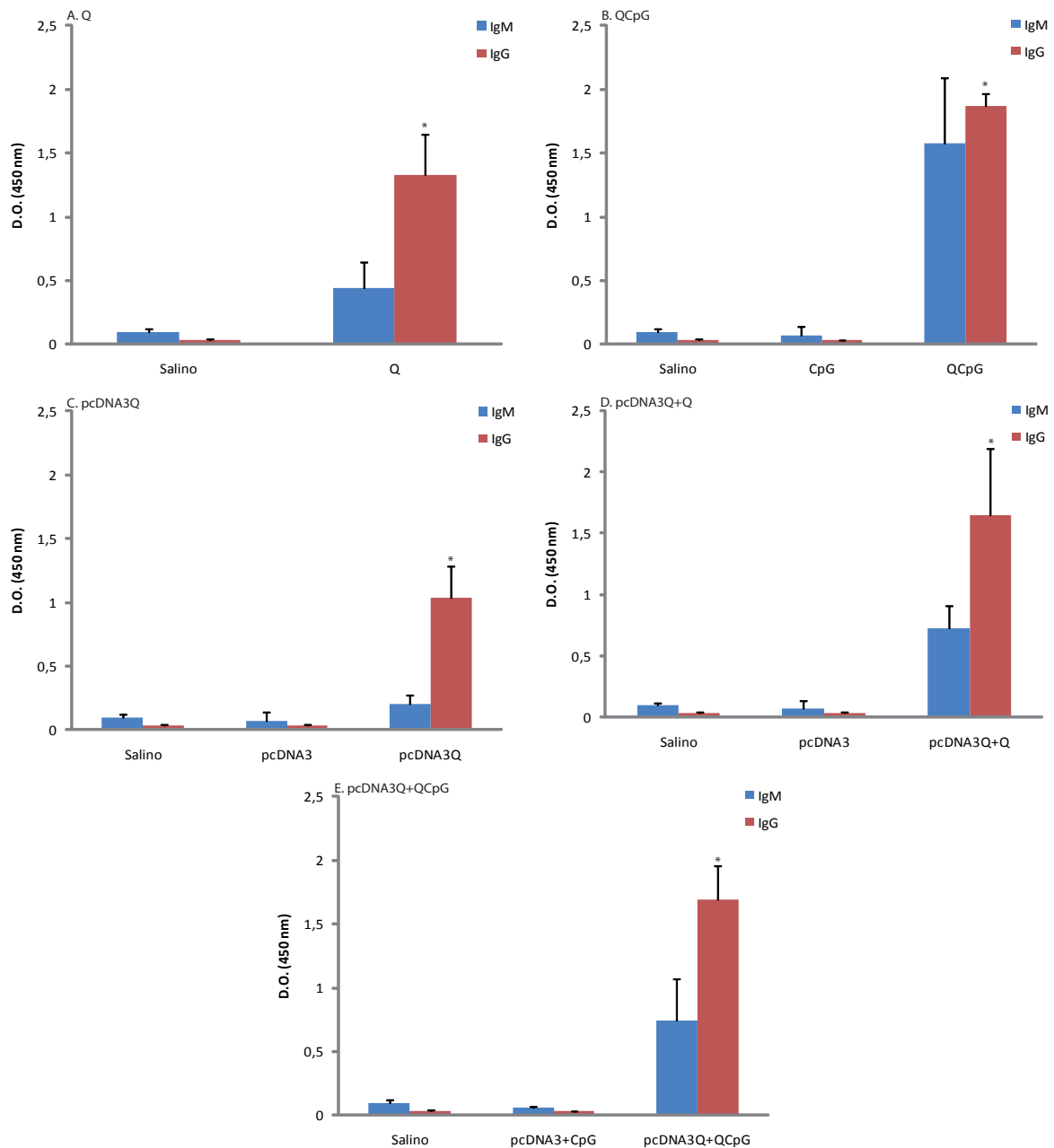


Figura 4.4. Análisis de la respuesta inmune humoral específica para Q en ratones BALB/c tras la segunda inmunización. Quince días después de la segunda inmunización los animales fueron sangrados y la respuesta de los anticuerpos tipo IgM e IgG fue probada frente a la Proteína Q por medio de ensayos de ELISA. Los sueros de los grupos inmunizados y sus respectivos controles fueron probados en una dilución 1:200. Panel A: formulación Q; panel B: formulación QCpG; Panel C: formulación pcDNA3Q; Panel D: formulación pcDNA3Q+Q y Panel E: formulación pcDNA3Q+QCpG. En el eje de abscisas se indica el grupo inmunizado y su(s) respectivo(s) control(es). En el de las ordenadas se muestra la D. O. * Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de IgG para cada formulación con su(s) respectivo(s) control(es) ($p < 0,05$).

A la vista de los resultados, se puede decir que la inoculación con las diferentes formulaciones de la PQ induce una respuesta de tipo humoral, promoviendo el cambio de isotipo, con la posible participación de células T. Por otra parte, la PQ sin adyuvante promueve la formación de anticuerpos tipo IgM e IgG, lo que permite indicar que es una proteína fuertemente inmunogénica. Asimismo, al evaluar la capacidad inmunoestimuladora del adyuvante se observó que la utilización de ODN con motivos CpG no metilados desde la primera dosis potencia la inmunogenicidad del antígeno generando una fuerte respuesta humoral.

Modulación de la respuesta IgG1 e IgG2a

Para evaluar el tipo de respuesta inmune producida se determinaron los niveles de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2a que se generan frente a la Q después de la segunda dosis. Se encontró que todas las formulaciones inducen altos niveles de IgG1 con valores similares para todos los grupos (Figura 4.5).

Todos los grupos dan lugar a una respuesta de tipo mixta. No obstante, se observa que los animales inmunizados con las formulaciones QCpG y pcDNA3Q+QCpG presentan los mayores niveles de anticuerpos de tipo IgG2a (Figura 4.5). Por otra parte, la inmunización con la Proteína Q, pcDNA3Q y pcDNA3Q+Q induce mayores niveles de IgG1.

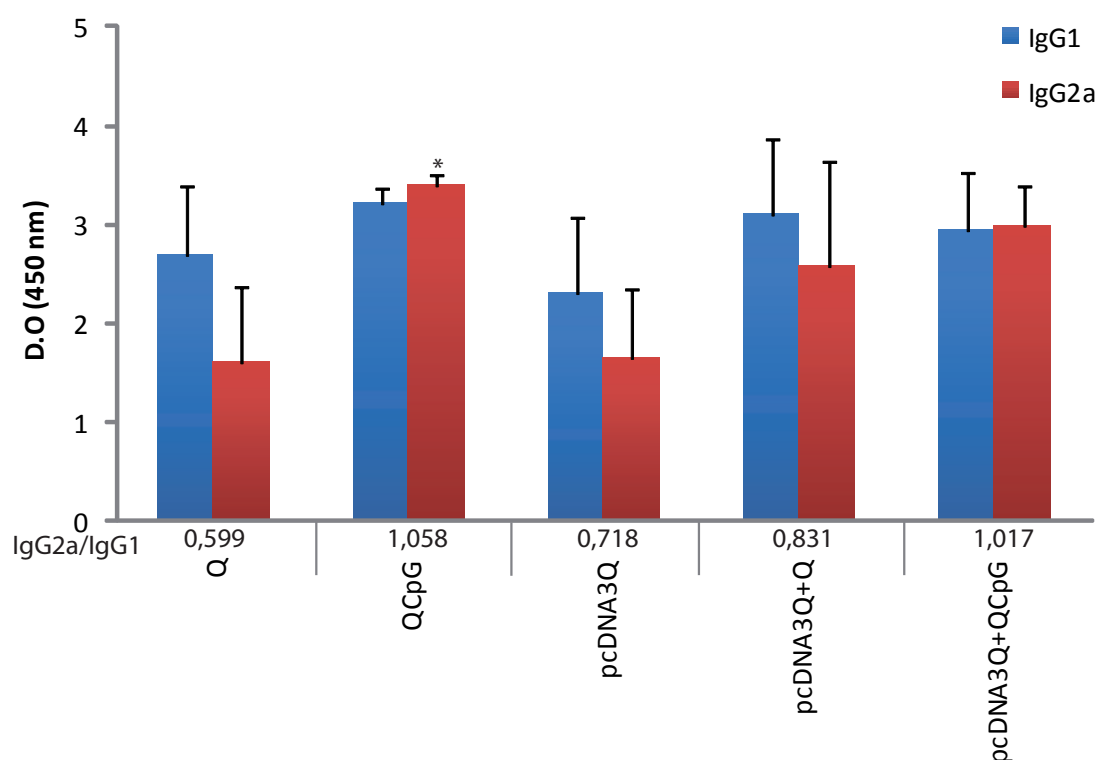


Figura 4.5. Análisis del tipo de respuesta humoral frente a la proteína Q. Los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2a específicos para la Proteína Q fueron testados en los sueros de los animales inmunizados tras la administración de la segunda dosis. Los sueros se probaron en una dilución 1:200. La relación IgG2a/IgG1 determinada para cada formulación se indica en la parte inferior del eje de las abscisas. * Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de IgG2a entre la formulación QCpG y Q ($p < 0,05$).

Respuesta inmune humoral generada frente a las proteínas LiH2A, Lip2b, LiP2a y Lip0

Se quiso determinar la respuesta de anticuerpos tipo IgG, IgG1 e IgG2a, con los sueros obtenidos después de la segunda inmunización, para cada uno de los determinantes antigénicos presentes en la Proteína Q: LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0.

Se encontró que los sueros de los cinco grupos de animales, a las diluciones usadas, no presentaron reactividad frente a las proteínas LiH2A y LiP0 (datos no mostrados).

Por otra parte, para la LiP2b el análisis de los datos revela que la formulación QCpG induce una fuerte formación de anticuerpos tipo IgG específicos para esta proteína (Figura 4.6, panel A). La respuesta generada es de tipo mixta, mostrando mayor reactividad los anticuerpos de isotipo IgG2a (figura 4.6, panel B).

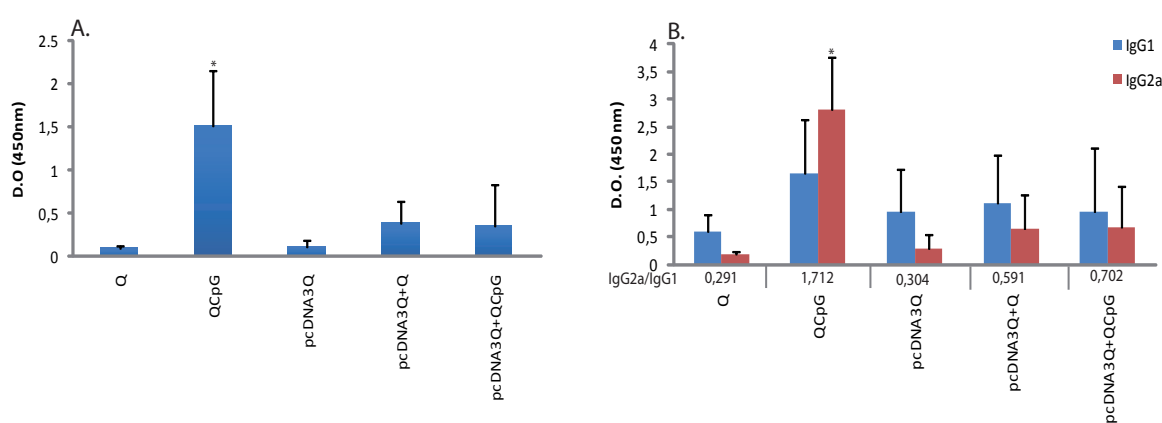


Figura 4.6. Análisis de la respuesta humoral frente a LiP2b. A. Sueros de los cinco grupos de animales vacunados fueron empleados para determinar la respuesta específica de los anticuerpos tipo IgG frente al determinante antigénico LiP2b. * Diferencia estadística significativa al comparar los niveles de IgG entre los cinco grupos inmunizados ($p < 0,05$). B. Determinación del tipo de respuesta inmune generada (IgG1 – IgG2a) por cada formulación frente a la proteína LiP2b. La relación IgG2a/IgG1 se indica en la parte inferior del eje de las abscisas. * Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de IgG2a entre los cinco grupos.

Caso similar ocurre con la LiP2a, donde se observa que la formulación QCpG induce altos niveles de anticuerpos de tipo IgG (Figura 4.7, panel A) y al igual que LiP2b, presenta una respuesta de tipo mixta, con mayores niveles de IgG2a (Figura 4.7, panel B).

En general los ratones inmunizados con la formulación QCpG presentan los mayores niveles tanto de IgG, IgG1 e IgG2a cuando se analizaron frente a LiP2a y LiP2b. Todo ello sugiere que estas dos proteínas son los principales determinantes inmunógenos de la Proteína Q.

4.3.2. Respuesta inmune celular generada frente a la Proteína Q

Los resultados previos sugieren que la producción de IgG, IgG1 e IgG2a varía con cada formulación. Para determinar si estas diferencias se pueden asociar con las variaciones en los perfiles de las citoquinas se realizaron ensayos de proliferación con las células provenientes del bazo y de los ganglios de los ratones inmunizados y los grupos control, previos a la infección. Las células fueron estimuladas *in vitro* con la proteína Q recombinante. Los sobrenadantes fueron recuperados, después de 72 horas, para determinar los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-4 en bazo y ganglio mediante ensayos de ELISA. Los datos mostrados corresponden a las medias de las densidades ópticas (D. O.).

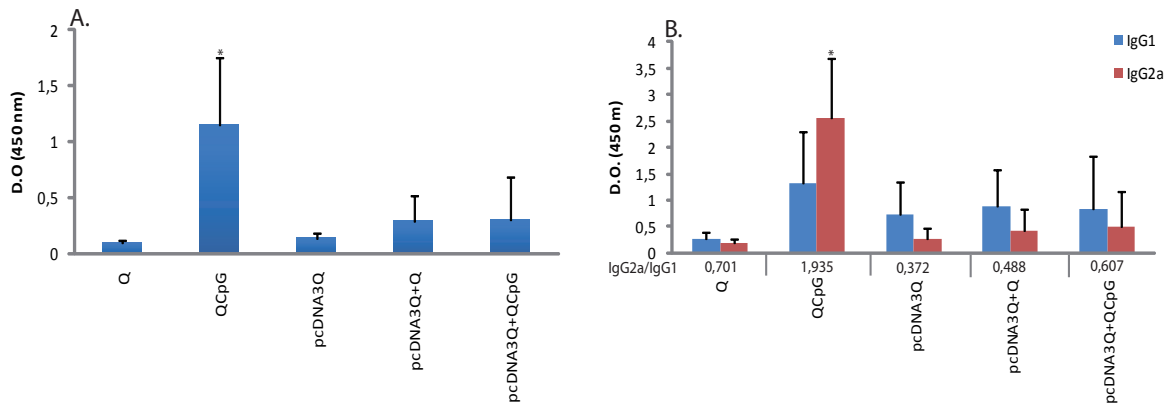


Figura 4.7. Análisis de la respuesta humoral frente a LiP2a. A. Sueros de los cinco grupos de animales vacunados fueron empleados en una dilución 1:200 para determinar la respuesta específica de los anticuerpos tipo IgG frente al determinante antigénico LiP2a. * Diferencia estadística significativa al comparar los niveles de IgG entre los cinco grupos inmunizados ($p < 0,05$). B. Determinación del tipo de respuesta inmune generada (IgG1 – IgG2a) por cada formulación frente a la proteína LiP2a. La relación IgG2a/IgG1 determinada para cada formulación se indica en la parte inferior del eje de las abscisas. * Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de IgG2a entre los cinco grupos ($p < 0,05$)

Las diferentes formulaciones de la Proteína Q inducen la síntesis de citoquinas Tipo Th1 y Th2.

En las células del bazo de los ratones inmunizados con la formulación Q y el grupo control salino se observa que hay una síntesis *in vitro* de IFN- γ , específico para Q (Figura 4.8, panel A). También se aprecian bajos niveles de IL-10, tanto para el grupo inmunizado como para el grupo control. Por otra parte, en las células de ganglio se detectaron niveles muy bajos de IFN- γ e IL-10.

Cuando se administra QCpG, la estimulación *in vitro* con la Q induce la producción de IFN- γ , específica para Q, en las células del bazo. Los niveles de IL-10 en este órgano están en el orden de 864 pg/ml. En el ganglio los valores para IFN- γ e IL-10 fueron de 3.071 y 339 pg/ml respectivamente (Figura 4.8, panel B).

La inmunización con pcDNA3Q induce la síntesis de altos niveles de IFN- γ en el bazo, mientras que para la IL-10 son muy bajos. A diferencia de las formulaciones anteriores, los niveles de IFN- γ en ganglio son ligeramente mayores que los de bazo, sin embargo en el caso de la IL-10 son menores (Figura 4.8, panel C).

La administración de pcDNA3Q+Q induce en el bazo niveles moderados de IFN- γ e IL-10. En el ganglio se puede apreciar que los niveles de INF- γ , alcanzan 981 pg/ml, mientras que para IL-10 son de 148 pg/ml (Figura 4.8, panel D).

En los ratones inmunizados con pcDNA3Q+QCpG, se observan altos niveles de IFN- γ (6021 pg/ml) en bazo, después de la estimulación. Asimismo los niveles de IL-10 en el mismo órgano son de 599 pg/ml. Por otra parte, los valores de IFN- γ en el ganglio se reducen casi a la mitad respecto al bazo (3.296 pg/ml) y para la IL-10 están en 195 pg/ml (Figura 4.8, panel E).

Una observación general es que no se detectaron niveles de IL-4, después de la estimulación, en ninguno de los grupos de animales inmunizados ni sus respectivos controles.

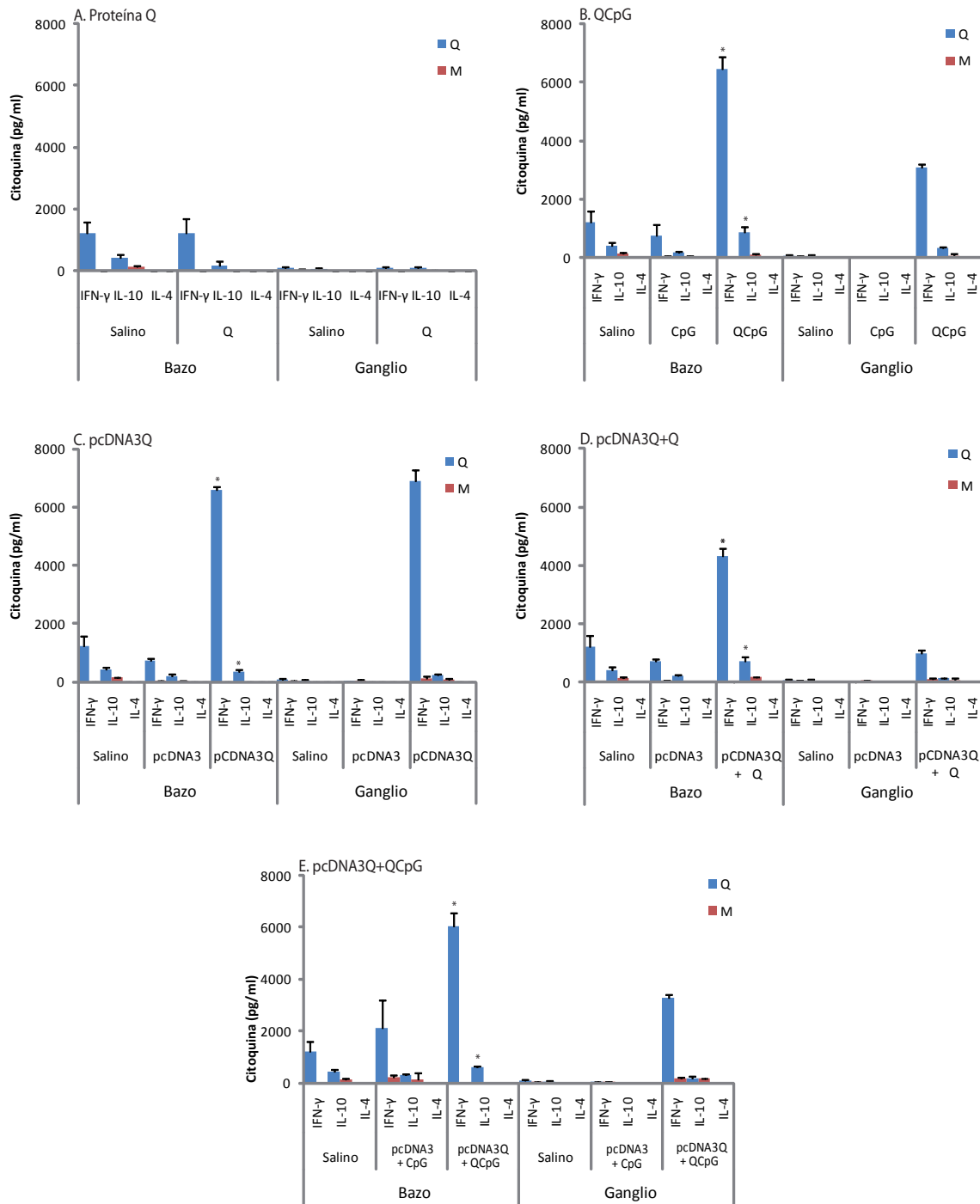


Figura 4.8. Respuesta inmune celular específica para Q. Análisis de la producción de citoquinas por ELISA de esplenocitos y células del ganglio drenante en los grupos de ratones inmunizados y control. Las células fueron estimuladas con la Proteína Q recombinante y trascurridas 72 horas los sobrenadantes fueron recuperados para determinar los niveles de citoquinas. A. Concentración de citoquinas inducidas tras la estimulación en los animales del grupo Q y salino; B. Grupo QCpC, salino y CpG; C. Grupo pcDNA3Q, salino y pcDNA3; D. Grupo pcDNA3Q+Q, salino y pcDNA3; E. Grupo pcDNA3Q+QCpG, salino y pcDNA3+CpG. (Q: células estimuladas con PQ – M: células sin estimular). *Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de citoquinas en los animales inmunizados respecto a sus grupos control ($p < 0,05$).

En la tabla 4.1 se resumen los datos obtenidos para las tres citoquinas analizadas en los diferentes grupos de animales empleados para el estudio.

Grupo	INF- γ (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		IL-4 (pg/ml)	
	Bazo	Ganglio	Bazo	Ganglio	Bazo	Ganglio
Salino	1218 \pm 372	77 \pm 35	414 \pm 106	39 \pm 15	0	0
CpG	758 \pm 354	0	179 \pm 23	0	0	0
pCDNA3	728 \pm 65	5 \pm 3	215 \pm 42	0	0	0
pcDNA3+CpG	2109 \pm 984	33 \pm 8	298 \pm 69	0	0	0
Q	1233 \pm 452	110 \pm 23	175 \pm 143	103 \pm 20	0	0
QCpG	6446 \pm 419	3071 \pm 113	864 \pm 210	339 \pm 22	0	0
pcDNA3Q	6589 \pm 130	6912 \pm 376	356 \pm 67	253 \pm 37	0	0
pcDNA3Q+Q	4297 \pm 283	981 \pm 133	720 \pm 133	148 \pm 4	0	0
pcDNA3Q+QCpG	6021 \pm 558	3296 \pm 112	599 \pm 64	195 \pm 56	0	0

Tabla 4.1. Cuantificación de los niveles de citoquinas específicas para la Proteína Q, en células de bazo y ganglio para los grupos de estudio. Los valores mostrados son la media de la D.O. obtenida al medir los sobrenadantes de forma individual, en el caso de los bazos. Para los ganglios la determinación se realizó en "pool".

Con el objeto de validar los datos obtenidos por ELISA para las citoquinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 y a la vez ampliar el perfil de citoquinas analizado, se determinó mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión para los genes que codifican las citoquinas: IL-2, IL-12a, IL-13, TGF- β , TNF- α . Para ello, las células de bazo estimuladas con la Proteína Q fueron tratadas con el reactivo de TRIzol, se realizó la extracción de RNA total y se cuantificó la expresión de los genes para las citoquinas mencionadas.

Como se puede apreciar en la figura 4.9 los resultados de expresión de los genes para las citoquinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 se correlacionan con los datos obtenidos por medio de los ensayos de ELISA. No se encontraron cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para las citoquinas IL-2, IL-12a, TGF- β y TNF- α , en los grupos de los animales inmunizados así como en los controles. Esto indica que las diferentes formulaciones de la Proteína Q no inducen la expresión de los genes que codifican para otras citoquinas tipo Th1 o reguladoras.

También se encontró que en todos los grupos de animales vacunados se induce la expresión del gen para la IL-13.

A continuación se presenta un resumen de los valores obtenidos para las citoquinas determinadas por RT-PCR (Tabla 4.2).

Es importante resaltar que las formulaciones QCpG y pcDNA3Q+QCpG inducen los mayores niveles de IFN- γ y que generan a su vez bajos niveles de IL-10 en relación con otras formulaciones.

En general, se encuentra que la administración de cualquiera de las cinco formulaciones de la Proteína Q induce una respuesta de tipo celular tanto Th1 como Th2. Estos hallazgos se correlacionan con los resultados obtenidos en el análisis de la respuesta humoral, donde se observa la presencia de anticuerpos del isotipo IgG1 e IgG2a específicos para la PQ en todas las formulaciones.

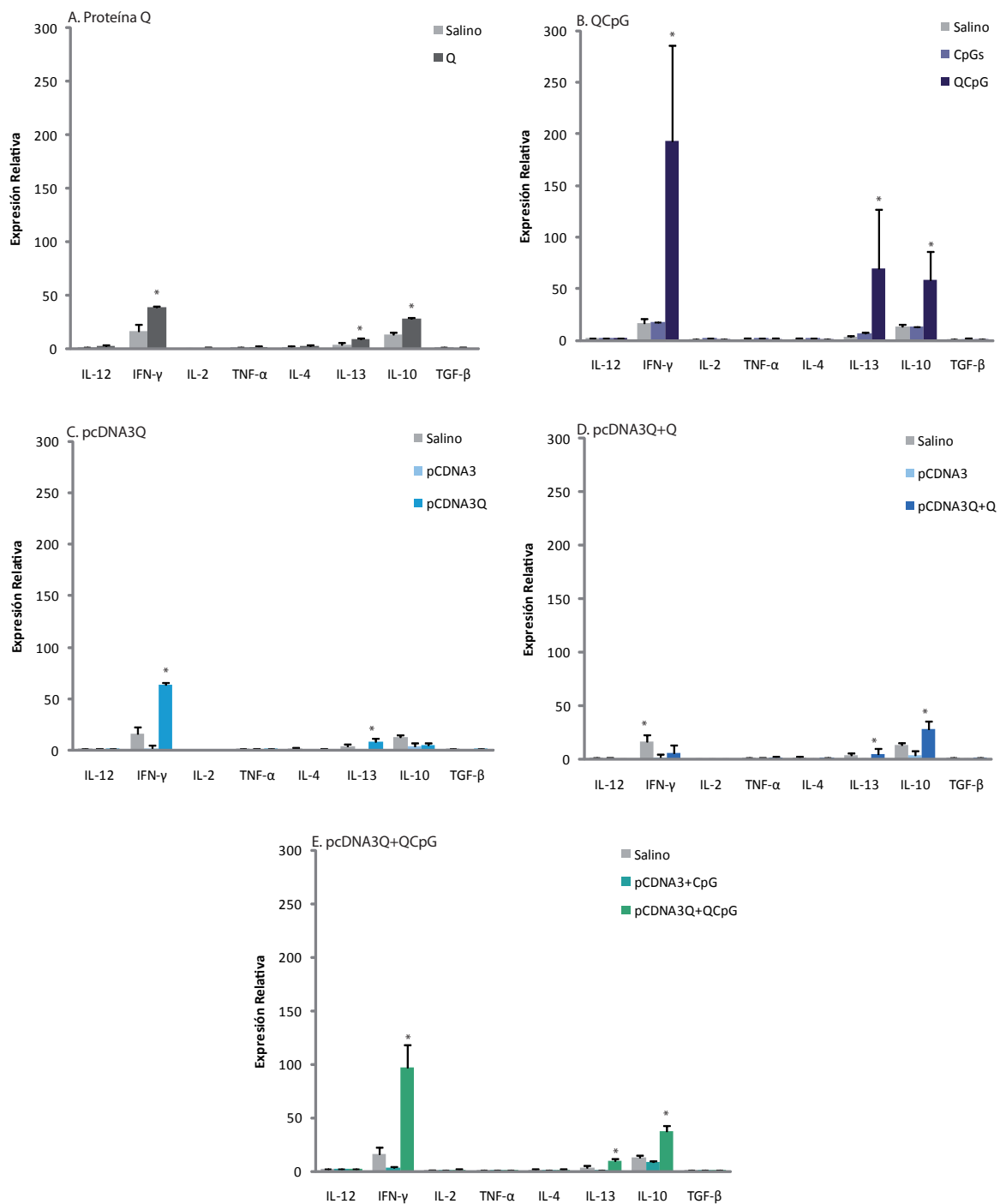


Figura 4.9. Perfil de citoquinas específicas para Q. Expresión de mRNA para IL-12a, INF-γ, IL-2, TNF-α, IL-4, IL-13, IL-10 y TGF-β. Después de la estimulación, se realizó la extracción de RNA total de las células de bazo de los animales inmunizados con las cinco formulaciones y los grupos control. Se determinó la expresión de los niveles por medio de RT-PCR en los animales inmunizados con la formulación: Q y salino(A), QCpG, salino y CpG (B), pcDNA3Q, salino y pcDNA3 (C), pcDNA3Q+Q, salino y pcDNA3 (D) y pcDNA3Q+QCpG, salino y pcDNA3+CpG (E). Los valores se representan como la media de los niveles de expresión relativa para cada grupo. * Diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de expresión de las citoquinas en los grupos de animales inmunizados respecto a sus grupos control ($p < 0,05$).

Grupo	IL-12a	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-13	IL-10	TGF β
Salino	1,95 \pm 0,1	16,40 \pm 6,3	0,68 \pm 0,2	1,57 \pm 0,1	1,58 \pm 1,0	3,65 \pm 2,6	13,22 \pm 2,2	1,47 \pm 0,1
CpG	2,19 \pm 0,08	17,45 \pm 6,3	1,84 \pm 0,3	2,16 \pm 0,2	1,58 \pm 0,07	6,17 \pm 1,4	13,22 \pm 0,8	1,65 \pm 0,13
pcDNA3	0,99 \pm 1,2	2,22 \pm 3,06	0,43 \pm 0,5	0,71 \pm 0,7	0,99 \pm 0,18	0,57 \pm 0,6	4,24 \pm 3,5	0,67 \pm 0,3
pcDNA3+CpG	1,82 \pm 0,34	3,46 \pm 1	0,79 \pm 0,3	0,82 \pm 0,1	0,89 \pm 0,1	1,18 \pm 0,3	8,51 \pm 1,5	0,81 \pm 0,1
Q	2,65 \pm 0,9	39,4 \pm 11	1,2 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3	2,62 \pm 0,5	9,44 \pm 1,2	28,22 \pm 10	1,22 \pm 0,2
QCpG	1,75 \pm 0,2	193,35 \pm 92	0,67 \pm 0,2	1,66 \pm 0,5	1 \pm 0,01	69,66 \pm 46	58,15 \pm 27	1,1 \pm 0,3
pcDNA3Q	1,93 \pm 0,1	63,26 \pm 3,1	0,65 \pm 0,04	1,91 \pm 0,1	1,25 \pm 0,3	8,91 \pm 2,7	5,72 \pm 1,5	1,66 \pm 0,2
pcDNA3Q+Q	1,13 \pm 0,03	6,15 \pm 3,8	0,50 \pm 0,06	2,14 \pm 0,5	1,53 \pm 0,3	5,25 \pm 3,5	28,63 \pm 7,8	1,72 \pm 0,12
pcDNA3Q+QCpG	1,92 \pm 0,07	96,52 \pm 21	1,48 \pm 1,18	1,60 \pm 0,12	1,53 \pm 0,3	9,67 \pm 2,3	37,44 \pm 5,6	1,50 \pm 0,1

Tabla 4.2. Determinación de los niveles de expresión citoquinas específicas para Q en las células de bazo de los diferentes grupos de estudio. Los valores mostrados son la media de unidades de expresión relativa, determinados por RT-PCR.

Respuesta inmune celular generada frente a las proteínas LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0

También se planteó analizar el tipo de respuesta celular generada frente a cada determinante antigénico de la PQ, tras la inmunización de los animales con las formulaciones Q, QCpG, pcDNA3Q, pcDNA3Q+Q y pcDNA3Q+QCpG. Para ello, se establecieron cultivos con esplenocitos de los ratones inmunizados y los grupos control, los cuales fueron estimulados con las proteínas recombinantes LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0. Trascorridas 72 horas los sobrenadantes fueron recuperados para determinar los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-4, por medio de ensayos de ELISA.

Cuando los ratones son inmunizados con la Q se inducen bajos niveles IFN- γ e IL-10, específicos para LiH2A, LiP2b y LiP2a, (Figura 4.10, panel A).

En los ratones inmunizados con la formulación QCpG se encuentra que hay niveles elevados de IFN- γ específico para LiH2A, LiP2b y LiP2a (figura 4.10, panel B), pero los valores mayores se encuentran para la LiP2b y LiP2a. Al analizar los niveles de IL-10 se encontraron valores bajos para la LiH2A, LiP2b y LiP2a.

La administración de pcDNA3Q induce altos niveles de IFN- γ específico para LiH2A, LiP2b y LiP2a, destacándose como superiores los correspondientes a la LiP2b y LiP2a. Los niveles de IL-10 son bajos para las tres proteínas (Figura 4.10, panel C).

Con la formulación pcDNA3Q+Q se producen altos niveles de IFN- γ , específico para la LiP2b y LiP2, mientras que para la LiH2A son menores. En el caso de la IL-10 solamente se encontraron diferencias significativas para los niveles de LiP2b, respecto a los grupos control (Figura 4.10, panel D).

Cuando se administra la formulación pcDNA3Q+QCpG se encuentra que los niveles de IFN- γ específicos para LiP2b y LiP2a son mayores que para la LiH2A (Figura 4.10, panel E). En el caso de IL-10 se encontraron bajos niveles de la citoquina para la LiH2A, LiP2b y LiP2a.

Una observación común a todas las formulaciones es que no se encontraron niveles de IFN- γ y/o IL-10 específica para el antígeno LiP0. De igual forma se determinó que no hay producción de IL-4 específica para ninguno de los componentes de la Q, datos que concuerdan con los obtenidos

cuando se realizó el análisis de la respuesta celular específica para la proteína Q.

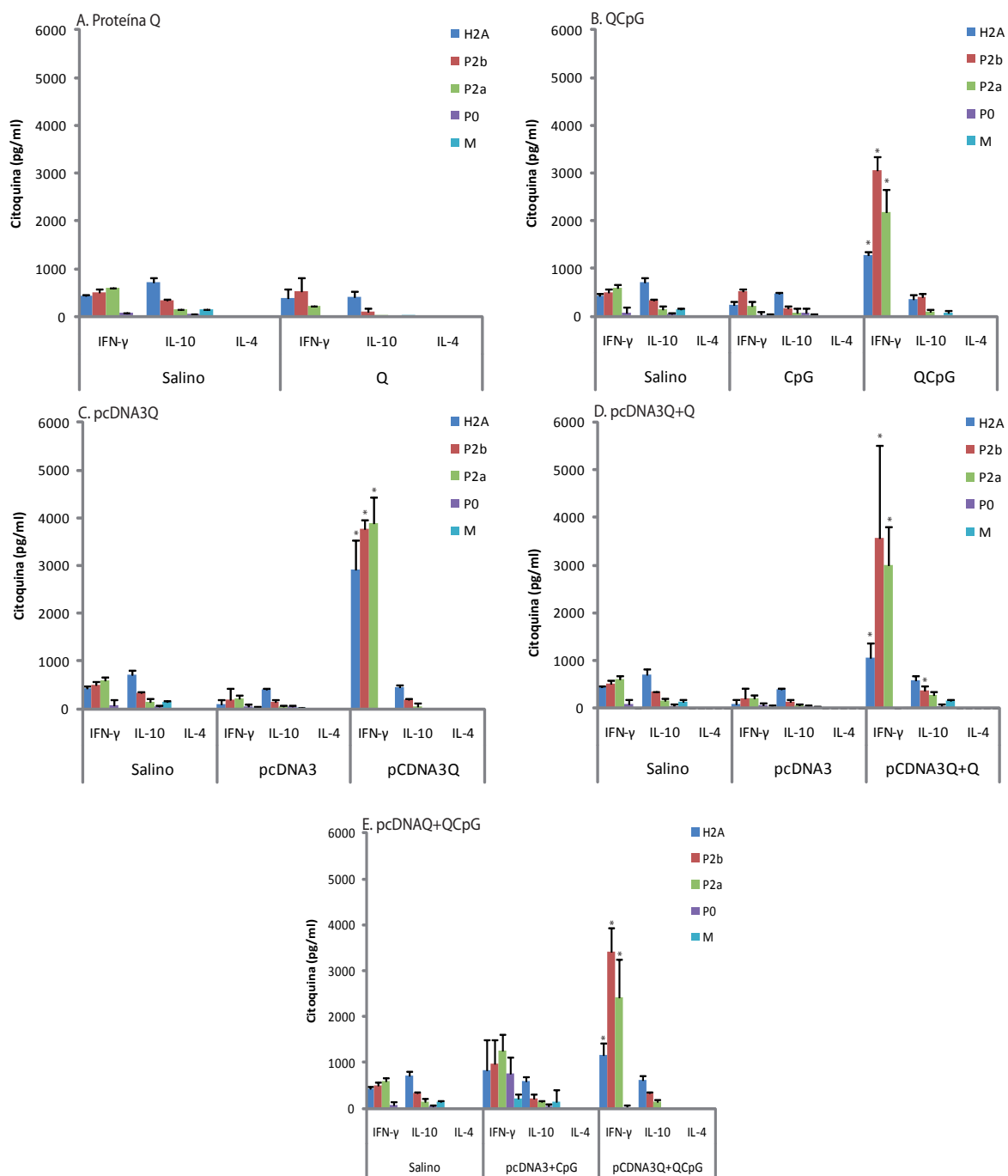


Figura 4.10. Respuesta inmune celular frente a los determinantes antigénicos de la Proteína Q. Análisis de la producción de citoquinas por ELISA de esplenocitos en los grupos de ratones inmunizados y control. Las células fueron estimuladas con las proteínas LiH2a, LiP2b, LiP2a y LiP0, trascurridas 72 horas los sobrenadantes fueron recuperados y se determinaron los niveles de citoquinas específicas para cada antígeno. A. Concentración de citoquinas en los animales del grupo Q y salino; B. Grupo QCpC, salino y CpG; C. Grupo pcDNA3Q, salino y pcDNA3; D. Grupo pcDNA3Q+Q, salino y pcDNA3; E. Grupo pcDNA3Q+QCpG, salino y pcDNA3+CpG. (M: células sin estimular). *Diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles citoquinas específicas para cada antígeno en los animales inmunizados respecto a sus grupos control ($p < 0,05$).

En la tabla 4.3 se resumen los valores obtenidos para cada citoquina frente a cada uno de los antígenos.

Grupo	IFN- γ (pg/ml)				IL-10 (pg/ml)				IL-4 (pg/ml)			
	LiH2A	LiP2b	LiP2a	LiP0	LiH2A	LiP2b	LiP2a	LiP0	LiH2A	LiP2b	LiP2a	LiP0
Salino	442 \pm 25	512 \pm 70	603 \pm 66	84 \pm 67	709 \pm 106	338 \pm 19	157 \pm 50	51 \pm 26	0	0	0	0
CpG	233 \pm 71	528 \pm 46	224 \pm 99	39 \pm 54	475 \pm 23	173 \pm 54	77 \pm 84	83 \pm 77	0	0	0	0
pcDNA3	98 \pm 84	195 \pm 125	215 \pm 63	60 \pm 46	397 \pm 27	147 \pm 40	59 \pm 19	49 \pm 21	0	0	0	0
pcDNA3+CpG	835 \pm 557	971 \pm 519	1264 \pm 324	769 \pm 342	586 \pm 108	200 \pm 102	153 \pm 14	62 \pm 35	0	0	0	0
Q	379 \pm 200	538 \pm 275	229 \pm 170	0	418 \pm 111	101 \pm 61	10 \pm 9	0	0	0	0	0
QCpG	1271 \pm 76	3063 \pm 281	2187 \pm 466	0	370 \pm 73	419 \pm 64	99 \pm 37	0	0	0	0	0
pcDNA3Q	2908 \pm 624	3767 \pm 199	3877 \pm 553	0	456 \pm 56	192 \pm 33	54 \pm 47	0	0	0	0	0
pcDNA3Q+Q	1054 \pm 318	3577 \pm 2376	3007 \pm 790	0	578 \pm 99	366 \pm 93	268 \pm 69	51 \pm 42	0	0	0	0
pcDNA3Q+QCpG	1153 \pm 273	3045 \pm 524	2418 \pm 840	33 \pm 24	610 \pm 100	336 \pm 32	138 \pm 46	0	0	0	0	0

Tabla 4.3. Cuantificación de los niveles de citoquinas específicas para las proteínas LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0 en células de bazo. Los valores mostrados son la media de la D.O. obtenidas al medir los niveles de citoquinas específicos para cada proteína de forma individual.

4.4. Análisis de la diversidad del repertorio CDR3 en ratones inmunizados con la Proteína Q y pcDNA3Q.

Los resultados de la respuesta humoral y celular permiten sugerir que las formulaciones de la PQ están induciendo respuestas diferentes en los cinco grupos de animales inmunizados. Se investigó si estas diferencias en la respuesta podían asociarse a cambios a nivel del receptor de las células T. El acercamiento intentó determinar diferencias entre el repertorio V β CDR3 generado tras la inmunización con la Proteína Q recombinante o en forma de vacuna de ADN. Para ello, se empleó el ADNc de esplenocitos de animales inmunizados con las formulaciones Q y pcDNA3Q estimulados con la Proteína Q. Mediante PCR se amplificaron las 24 familias de la región V β para el receptor de las células T, los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador automático y los datos generados se recuperan con el software Peak Scanner que permite obtener los espectratipos. El análisis de los espectratipos se realizó por medio del programa ISEApeaks[®]. Como control del experimento se utilizaron células de bazo de los ratones del grupo control salino, estimuladas con medio.

Todos los espectratipos de las 24 familias correspondientes a cada uno de los animales analizados en este estudio pueden ser consultados en el anexo 1.

Los resultados obtenidos permiten corroborar que de las 24 familias V β descritas para BALB/c tres de ellas no son funcionales (V β 5.3, V β 17 y V β 19) tal y como también está descrito por otros autores (Pannetier, Cochet et al. 1993). Además, en las familias V β 3.1, V β 5.1, V β 5.2, V β 11 y V β 20, que son de baja expresión en ratones BALB/c (Pannetier, Cochet et al. 1993; Kitaura, Kanayama et al. 2009), se observan distorsiones en los perfiles de espectratipos. Por tales razones el análisis posterior de los datos no incluye estas familias.

Los perfiles de CDR3 de los animales control mostraron una distribución Gausiana, característica de una población de TCR en reposo (Gorochov, Neumann et al. 1998; Hori, Collette et al. 2002) (Figura 4.11).

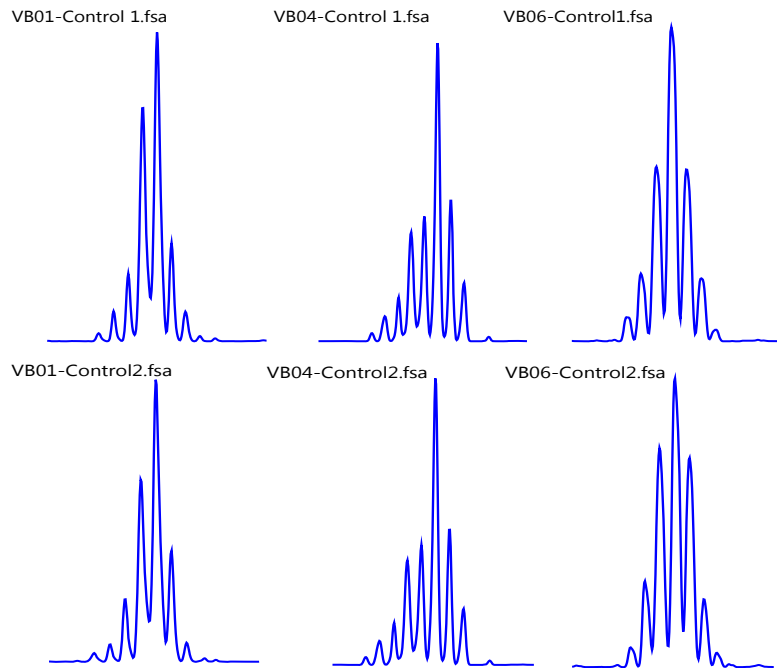


Figura 4.11. Perfil CDR3 controles. El segmento VB del TCR fue amplificado para los animales inmunizados y el grupo control. Se muestran los perfiles de los espectratipos correspondientes a las familias Vβ01, Vβ04 y Vβ06, para los controles 1 y 2.

El análisis de los datos por inspección visual hizo difícil establecer diferencias entre los grupos de animales inmunizados con la PQ y los inmunizados con pcDNA3Q. Por tal razón, se realizó un segundo análisis matemático y computacional para determinar la diversidad del repertorio de CDR3. Este método se basa en la estimación de la media de la perturbación del repertorio del TCR, para un grupo de interés, respecto a la distribución de frecuencia obtenida para el grupo control. El análisis de los datos revela que la estimulación *in vitro* con la PQ induce cambios en el repertorio de las familias analizadas de los animales vacunados con las formulaciones Q y pcDNA3Q, con respecto al control. Se pudo determinar que las familias que presentan valores mayores al 15% de perturbación en su repertorio, para los dos grupos de animales inmunizados, son la Vβ9, Vβ12, Vβ16 y Vβ18 (Figura 4.12). Se encontró que sólo los animales inmunizados con la formulación pcDNA3Q presentan mayores valores de perturbación para las familias Vβ2, Vβ7 y Vβ10. Asimismo este grupo de animales presenta valores mayores de perturbación en el repertorio CDR3 si se comparan con los ratones inmunizados con la PQ (Figura 4.13). Para fortalecer estas observaciones, se realizó un análisis estadístico aplicando el algoritmo de agrupamiento por medias *k* (*k-means clustering*), (Collette, Cazenave et al. 2003). En la figura 4.14, se observa la separación en dos grupos: en la parte superior el de los animales inmunizados con la Proteína Q y en segundo lugar el de los inmunizados con pcDNA3Q, basada en la perturbación de cada una de las familias.

Los datos aquí mostrados permiten sugerir que la inoculación con la formulación pcDNA3Q induce alteraciones profundas en el repertorio Vβ CDR3, significativamente diferentes a las inducidas por la administración de la Proteína Q recombinante.

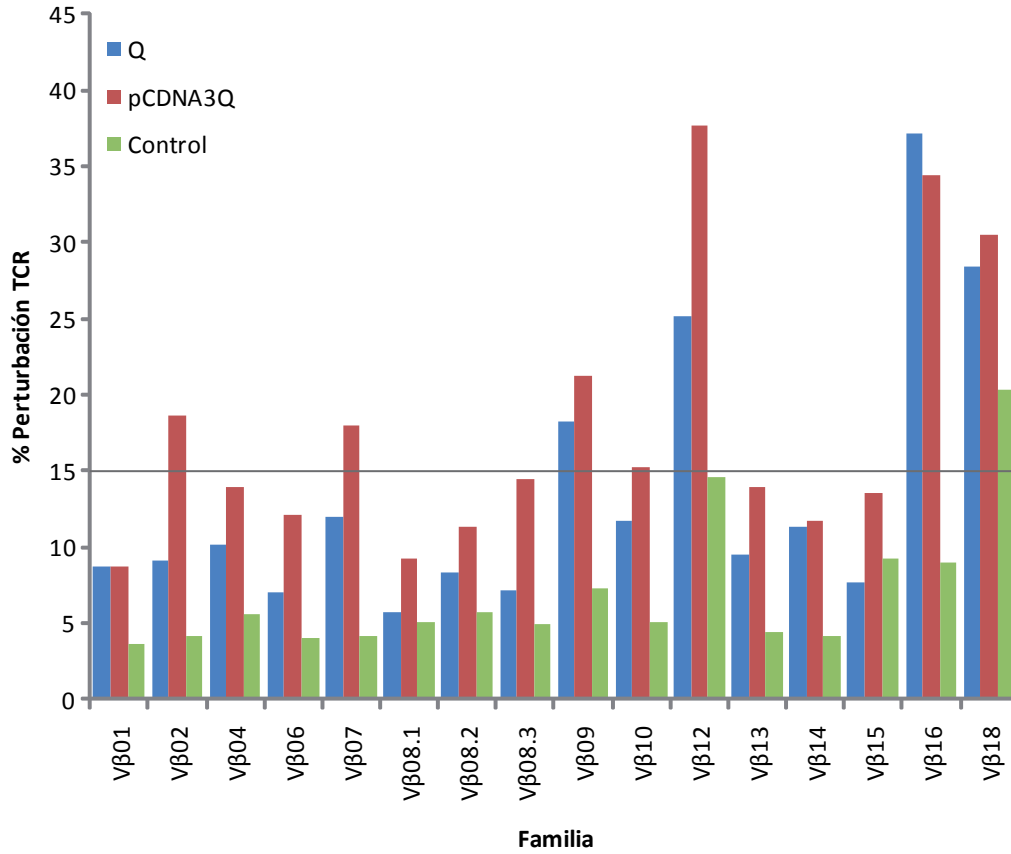


Figura 4.12. Porcentaje de perturbación TCR Vβ. La estimulación, con la PQ, de esplenocitos de los animales inmunizados con las formulaciones Q y pCDNA3Q induce cambios en el repertorio TCR.

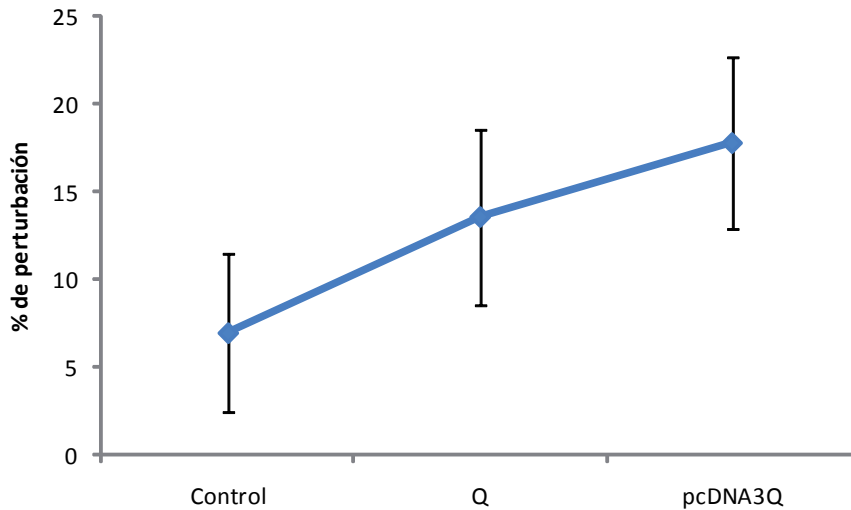


Figura 4.13. Porcentaje de perturbación por grupos de estudio. La media de las perturbaciones para cada una de los grupos analizados se muestra con sus respectivas desviaciones estándar. Repertorios con una media de perturbación cero, son idénticos al repertorio de referencia y los valores cercanos a 100, indican un repertorio completamente perturbado.

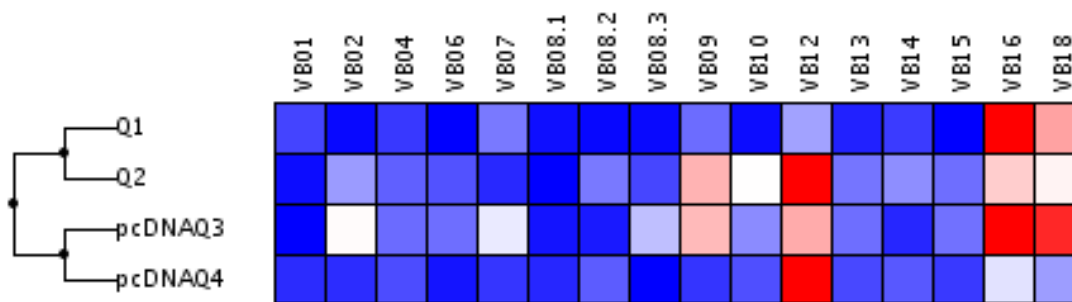


Figura 4.14. Algoritmo de agrupamiento por medias k. El repertorio Vβ de las células de los animales inmunizados es agrupado por “*k-mean Clustering*”. La agrupación jerárquica permite observar dos grupos bien definidos; en la parte superior animales inmunizados con la PQ y en la inferior los inmunizados con pcDNA3Q. Los tonos rojos resaltan las familias que presentan porcentajes de perturbación mayores de 15.

4.5. Análisis del desarrollo de la enfermedad en el modelo susceptible BALB/c frente al reto con *L. major*

Con el fin de evaluar la eficacia de la respuesta generada tras la infección, en ratones vacunados, se llevaron a cabo ensayos para analizar la progresión de la enfermedad provocada por la infección con *L. major*.

4.5.1. Análisis de la evolución de la infección causada por *Leishmania major*

Para comprobar si la respuesta generada por alguna de las formulaciones induce algún grado de protección frente a la infección con *L. major*, se infectaron ratones con 5×10^4 promastigotes estacionarios un mes después de la segunda dosis y se realizó un seguimiento de la inflamación de la almohadilla plantar.

En la tercera semana después de la infección se hace evidente la inflamación de la almohadilla plantar de los animales vacunados con la formulación Q, pcDNA3Q y pcDNA3Q+Q (Figura 4.15, paneles A-C y D). En estos ratones la inflamación aumentó progresivamente y de forma similar a los controles. Por esta razón, en la sexta semana se procedió al sacrificio de los animales debido a la presencia de necrosis y lesiones ulcerativas.

Por el contrario, en el grupo de ratones vacunados con la formulación QCpG (N=4) se observa una inflamación de menor intensidad y un retraso en la aparición de las lesiones ulcerativas en 2 animales (Figura 4.14, panel B QCpG R). En la otra mitad de los animales se observó un comportamiento similar a los controles (QCpG NR). Resultados similares se obtuvieron en un segundo experimento utilizando la misma formulación.

Una respuesta parecida se observa en los ratones inmunizados con la formulación pcDNA3Q+QCpG, donde la mitad de los animales presenta una inflamación de menor intensidad (pcDNA3Q+QCpG R), mientras que en la otra mitad se observa un aumento progresivo de la misma, similar a la de los controles (pcDNA3Q+QCpG NR) (Figura 4.14, panel E).

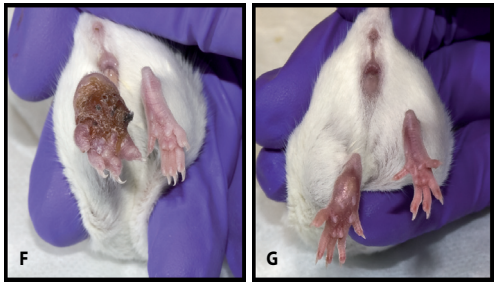
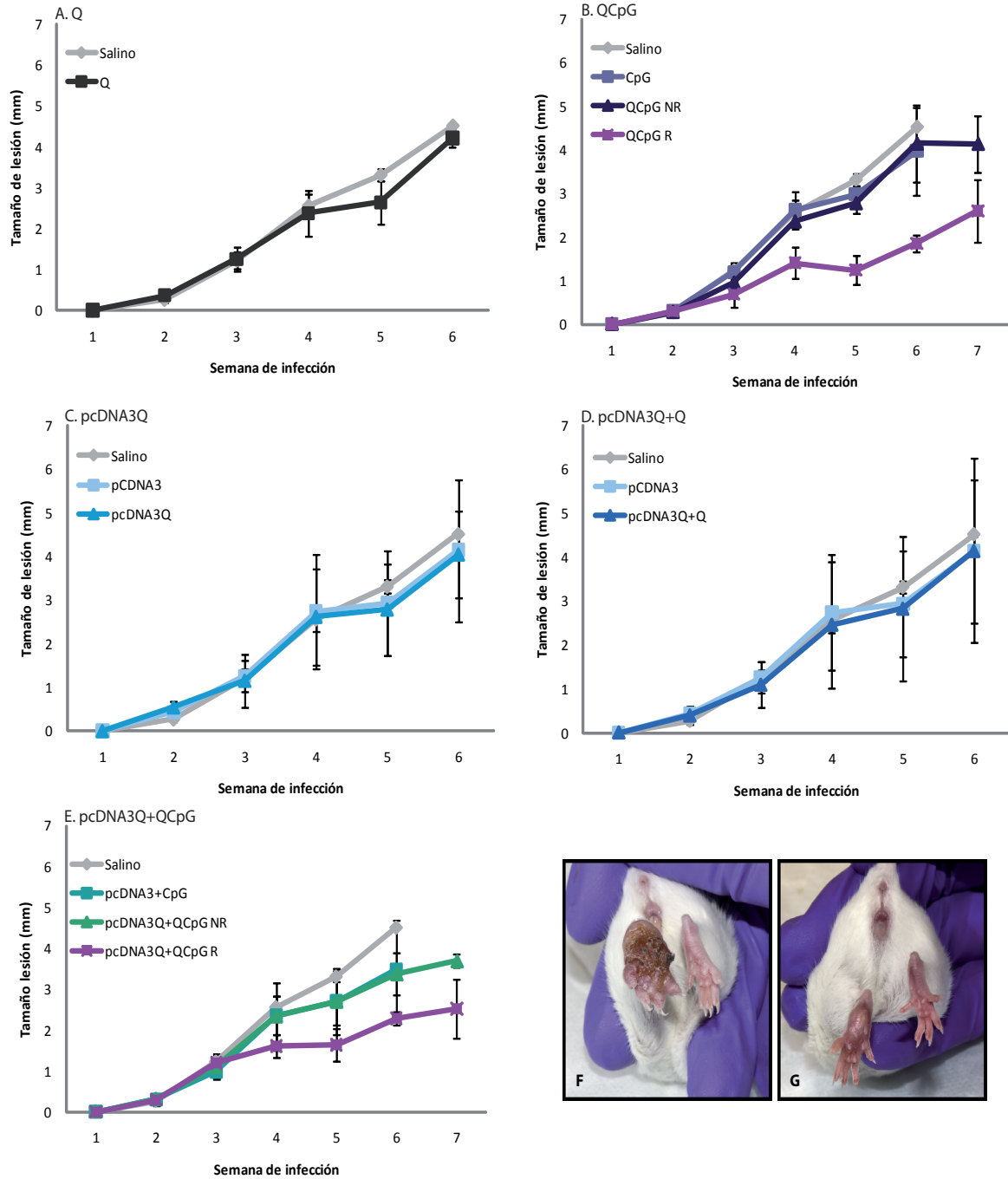


Figura 4.15. Curso de la infección por *L. major* en ratones susceptibles BALB/c vacunados con las diferentes formulaciones de la Proteína Q. Los ratones fueron inmunizados con Proteína Q (Panel A), QCpG (Panel B), pcDNA3Q (Panel C), pcDNAQ+Q (Panel D) y pcDNAQ+QCpG (Panel E). Los controles recibieron PBS, adyuvante o pcDNA3 vacío. Se realizaron dos inoculaciones espaciadas 15 días. Un mes después de la última dosis los ratones se infectaron con 5×10^4 promastigotes estacionarios de *L. major* inoculados por vía s.c. en la almohadilla plantar izquierda. La evolución de las lesiones se midió semanalmente con un calibre digital. La inflamación se expresa como la diferencia de grosor entre la almohadilla plantar inflamada y la almohadilla plantar sana. Cada punto representa la media del tamaño de la lesión (mm) y la DS de los grupos de ratones vacunados sus controles. En el caso del grupo QCpG y pcDNA3Q+QCpG la anotación: QCpG R y pcDNA3Q+QCpG R, hace referencia a la media de los ratones que logran un retraso en la evolución de la lesión. En el panel F se muestran las lesiones representativas del grupo salino y en el G las lesiones representativas de los animales que retrasan la inflamación del grupo QCpG en la sexta semana de infección.

Por otra parte, se analizó la carga parasitaria en el bazo y el ganglio ipsilateral de los animales vacunados y los grupos control. Los resultados muestran que para los animales inmunizados con la formulación Q, pcDNA3Q y pcDNA3Q+Q no hay diferencias en la carga parasitaria del bazo y del ganglio respecto a los grupos control (Figura 4.16, paneles A, C y D). De otro lado, se aprecia que en los animales inmunizados con la formulación QCpG y pcDNA3Q+QCpG, los ratones que retrasan la aparición de las lesiones (QCpG R) y (pcDNA3Q+QCpG R) no se detectan parásitos en el bazo (Figura 4.16, paneles B y E respectivamente).

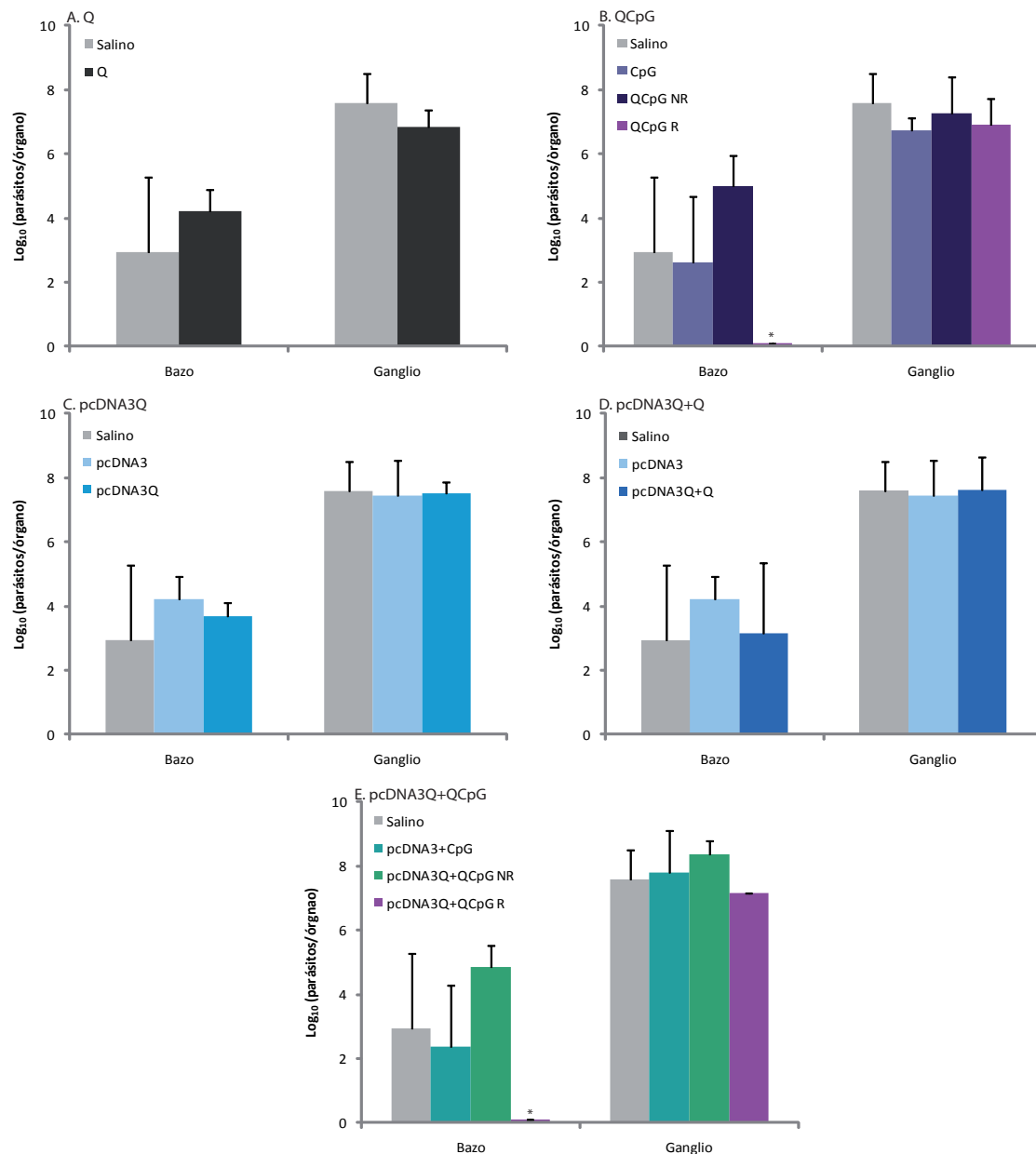


Figura 4.16. Carga parasitaria en bazo y ganglio de los ratones BALB/c infectados después de la vacunación. Los ratones fueron vacunados como se describió en la figura anterior. Seis semanas después de la infección con promastigotes metacíclicos, fueron sacrificados y se estimó la carga parasitaria en células del bazo y el ganglio mediante dilución límite. Panel A carga parasitaria de los ratones del grupo inmunizado con Q y control salino; B: grupo QCpG y controles CpG y salino; C: Grupo pcDNA3Q y controles pcDNA3 y salino; D: grupo pcDNA3Q+Q y controles pcDNA3 y salino; E: grupo pcDNA3Q+QCpG y controles pcDNA3+CpG y salino.

* Diferencia estadística significativa de los animales que retrasan la inflamación y sus correspondientes grupos control ($p < 0,001$).

4.6. Análisis de la respuesta inmune generada en los ratones vacunados tras la infección experimental con *L. major*

En el siguiente apartado se describen los experimentos realizados para determinar los parámetros inmunes generados en respuesta a la infección. Para ello se determinó la respuesta humoral frente a SLA y la Proteína Q en los ratones inmunizados y los grupos control. Posteriormente, se realizaron ensayos para valorar la respuesta celular generada frente a SLA en los mismos grupos de animales.

4.6.1. Respuesta inmune humoral frente a SLA y Proteína Q

Se obtuvo suero de los animales infectados previo el sacrificio y se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2a frente a SLA. Los resultados revelan que al final de la infección se genera una respuesta humoral frente a los antígenos del parásito, tanto en los animales vacunados como en los controles. En todos los casos la respuesta es de tipo mixta, con un predominio de anticuerpos del subtipo IgG1 (Figura 4.17, paneles A-E).

También se analizó la respuesta inmune generada tras la infección frente al antígeno. Se pudo determinar que los animales del grupo control no generaron anticuerpos frente a la Proteína Q. Además, los animales vacunados con la formulación Q y los animales pcDNA3Q+QCpG NR generan una respuesta de tipo mixta con un nivel ligeramente mayor de anticuerpos de tipo IgG1. En todas las demás formulaciones se observa que la respuesta sigue siendo de tipo mixta con predominio de anticuerpos del tipo IgG2a (Figura 4.18).

4.6.2. Respuesta celular.

Células del bazo fueron obtenidas para realizar ensayos de estimulación con SLA, y realizar la extracción de RNA total con el fin determinar los niveles de expresión de IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β e iNOS.

En las células de bazo de los ratones inmunizados con la Proteína Q se observa un aumento en la expresión de los genes que codifican IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-10 e iNOS (Figura 4.19, panel A).

Los ratones inmunizados con QCpG presentan los menores niveles de citoquinas analizados, respecto a las demás formulaciones. Se observa un leve aumento en la expresión de los genes que codifican para IL-4, IL-13, sin encontrar diferencias entre los animales QCpG NR y QCpG R (Figura 4.19, panel B).

En los animales inmunizados con la formulación pcDNA3Q se observa un aumento en los niveles de expresión de IFN- γ , IL-4, IL-13 e iNOS y en menor grado de IL-10, con respecto a los grupos control (Figura 4.19, panel C).

Cuando se administra pcDNA3Q+Q se observa un leve incremento en los niveles de expresión de IFN- γ y TNF- α y niveles mayores de IL-4, IL-13 e iNOS (Figura 4.19, panel D).

En el grupo de animales vacunados con la formulación pcDNA3Q+QCpG se observan bajos niveles en la expresión de IFN- γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF- β e iNOS. Destaca los altos niveles de expresión para IL-13 (Figura 4.19, panel E).

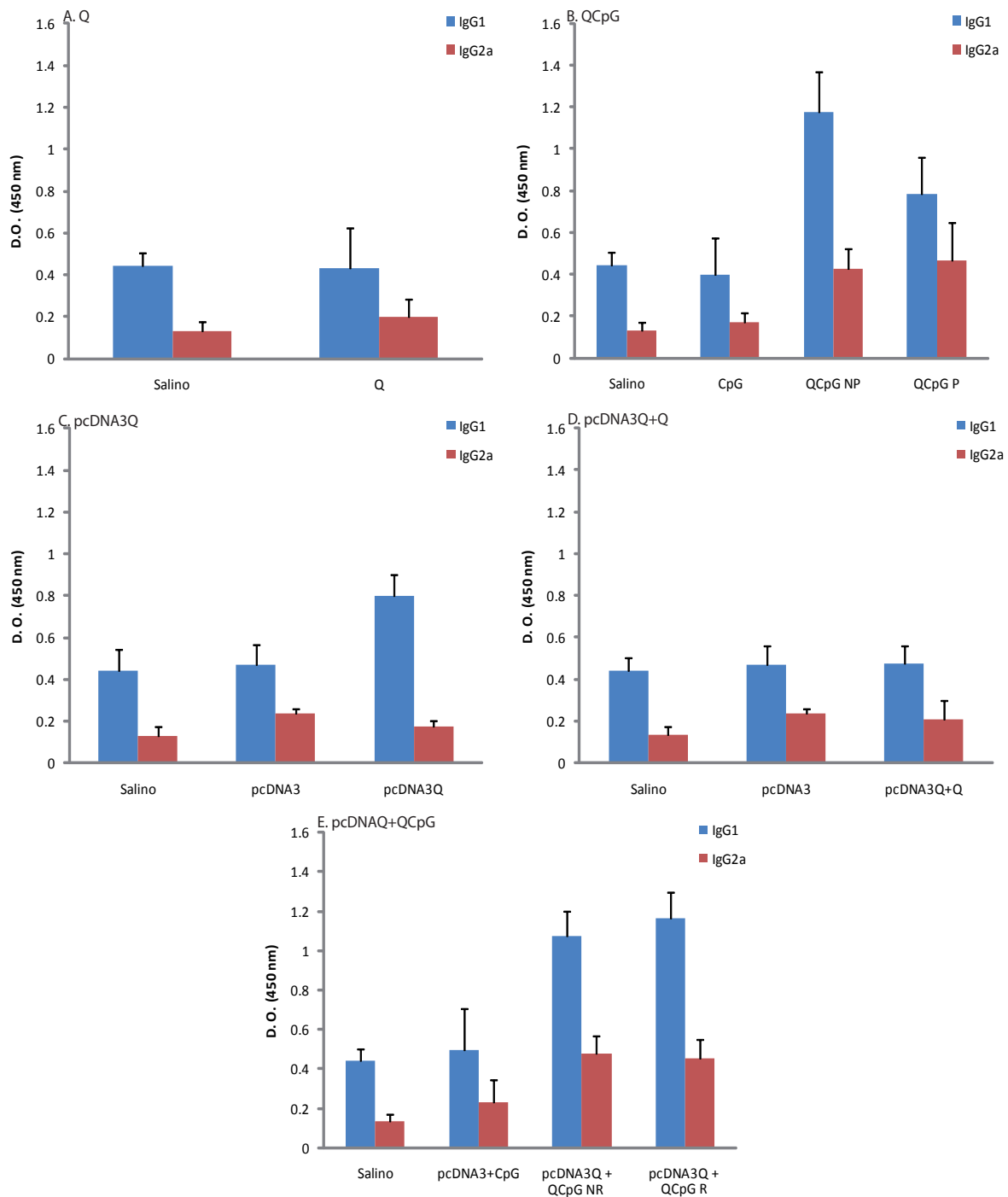


Figura 4.17. Análisis del tipo de respuesta humoral frente a SLA. Seis semanas después de la infección con 5×10^4 promastigotes metacíclicos, se realizó un sangrado de los animales vacunados y los grupos control. Los sueros fueron empleados para determinar los niveles de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2a frente a SLA, en una dilución 1:200.

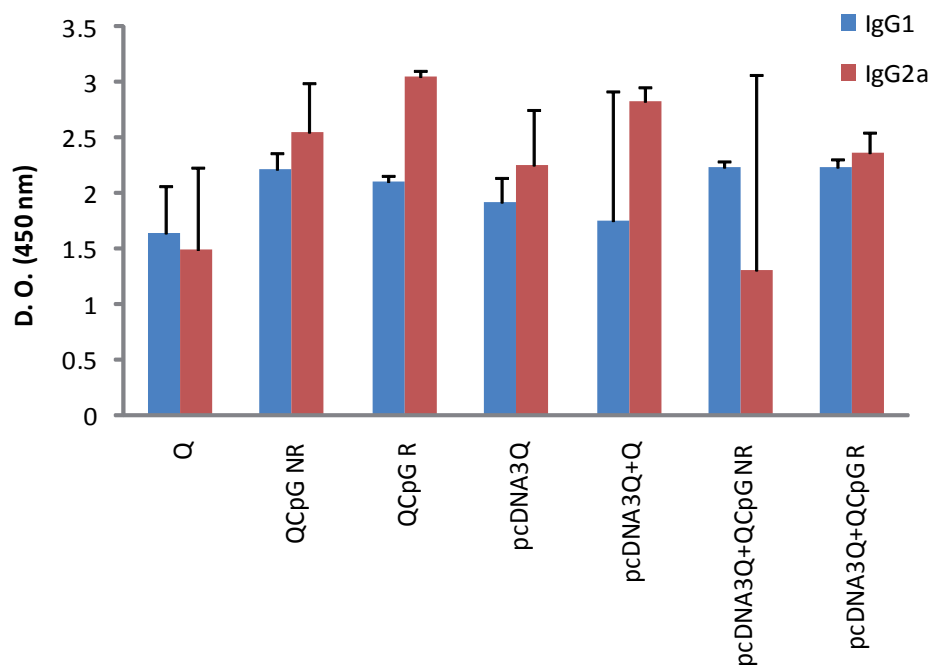


Figura 4.18. Tipo de respuesta humoral frente a Q tras la infección. Se analizó el tipo de respuesta humoral generada tras la infección. Los sueros de los animales inmunizados y los grupos control fueron probados a una dilución 1:200 para determinar los valores de IgG1 e IgG2a frente a la PQ. Los grupos control no presentaron reactividad contra la Q.

En la tabla 4.4 se resumen los valores obtenidos para las citoquinas analizadas en los grupos vacunados y controles.

En general, se encuentra que las formulaciones Q, pcDNA3Q y pcDNA3Q+Q no logran proteger a los animales frente al reto experimental con *L. major*. Las formulaciones QCpG y pcDNA3Q+QCpG deben ejercer alguna influencia en el desarrollo de la enfermedad porque logran retrasar la inflamación en la mitad de los animales infectados aunque no de suficiente capacidad como para evitar la aparición de los síntomas de la infección.

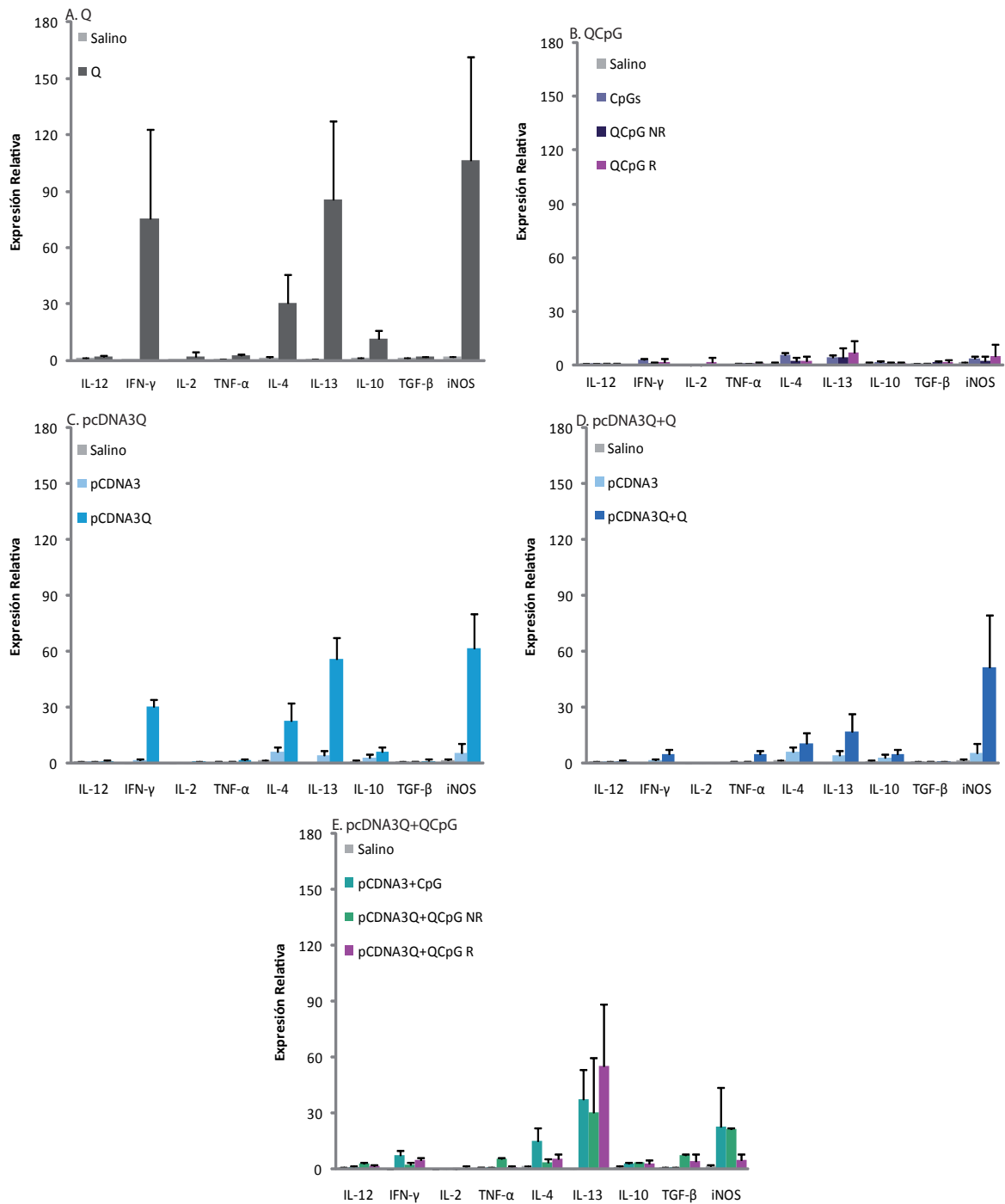


Figura 4.19. Respuesta celular frente a SLA. Expresión de mRNA para IL-12a, INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β e iNOS. Después de la estimulación, se realizó la extracción de RNA total de las células de bazo de los animales inmunizados con las cinco formulaciones y los grupos control. Se determinó la expresión de los niveles por medio de RT-PCR en los animales inmunizados con la formulación: Q y salino(A), QCpG, salino y CpG (B), pcDNA3Q, salino y pcDNA3 (C), pcDNA3Q+Q, salino y pcDNA3 (D) y pcDNA3Q+QCpG, salino y pcDNA3+CpG (E). Los valores se representan como la media de los niveles de expresión relativa para cada grupo.

Grupo	IL-12a	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-13	IL-10	TGF- β	iNOS
Salino	1,26 \pm 0,1	0,17 \pm 0,03	0,11 \pm 0,06	0,79 \pm 0,1	1,62 \pm 0,2	0,48 \pm 0,1	1,29 \pm 0,3	1,1 \pm 0,03	1,74 \pm 0,4
CpG	1,05 \pm 0,1	3,10 \pm 0,6	0,29 \pm 0,2	0,68 \pm 0,3	5,74 \pm 1,4	4,5 \pm 1,2	2,15 \pm 0,5	0,79 \pm 0,2	3,89 \pm 1
pcDNA3	1,06 \pm 0,2	1,71 \pm 0,4	0,24 \pm 0,08	0,80 \pm 0,2	6,40 \pm 2,4	4,67 \pm 2,2	3,31 \pm 1,4	0,83 \pm 0,1	5,70 \pm 3,7
pcDNA3+CpG	1,27 \pm 0,4	7,5 \pm 2,5	0,58 \pm 0,1	1,03 \pm 0,06	15,2 \pm 5,9	37,3 \pm 14	3,34 \pm 0,06	0,89 \pm 0,09	22,6 \pm 11
Q	1,90 \pm 0,6	75 \pm 37	1,98 \pm 1	2,66 \pm 0,4	30,8 \pm 12	85,3 \pm 40	11,3 \pm 4	1,86 \pm 0,3	106,6 \pm 50
QCpG NR	0,96 \pm 0,3	1,16 \pm 0,9	0,24 \pm 0,1	1,44 \pm 0,1	2,33 \pm 1,2	4,57 \pm 1,5	1,07 \pm 0,8	2,09 \pm 0,5	2,64 \pm 1,7
QCpG R	0,87 \pm 0,3	2,13 \pm 1	2,03 \pm 2	1,16 \pm 0,6	2,64 \pm 1,4	7,14 \pm 3,9	1,20 \pm 0,9	1,71 \pm 0,9	5,43 \pm 3,5
pcDNA3Q	1,46 \pm 0,3	30,3 \pm 4	1,06 \pm 0,4	1,85 \pm 0,5	22,6 \pm 9	55,7 \pm 11	6,54 \pm 2	1,47 \pm 0,6	61,5 \pm 18
pcDNA3Q+Q	1,09 \pm 0,5	4,9 \pm 1,6	0,32 \pm 0,2	4,77 \pm 1,8	10,7 \pm 5,3	17,2 \pm 9	4,70 \pm 2,5	1,14 \pm 0,2	51,7 \pm 25
pcDNA3Q+QCpG NR	2,8 \pm 1,1	2,21 \pm 1,1	0,19 \pm 0,06	5,75 \pm 0,5	3,83 \pm 1,5	30,4 \pm 19	3,42 \pm 0,06	7,27 \pm 1,1	21,5 \pm 0,6
pcDNA3Q+QCpG R	1,66 \pm 0,9	4,19 \pm 1,6	0,80 \pm 0,7	1,16 \pm 0,6	5,57 \pm 2,1	55,6 \pm 30	3,21 \pm 1,6	4,5 \pm 3,5	4,8 \pm 3

Tabla 4.4. Determinación de los niveles de expresión citoquinas específicas para SLA en las células de bazo de los diferentes grupos de estudio. Los valores mostrados son la media de unidades de expresión relativa, determinados por RT-PCR.

4.7. Análisis de la diversidad del repertorio CDR3 en ratones vacunados que retrasan la inflamación

El análisis de los datos después de la infección revela que de las cinco formulaciones probadas, dos (QCpG y pcDNA3Q+QCpG) logran retrasar la aparición de las lesiones en el 50% de los animales. Por tal motivo, se buscó analizar la diferencia entre el repertorio del TCR de los animales que presentan un retraso en la aparición de las lesiones respecto a los que desarrollan la enfermedad. Las muestras seleccionadas para este ensayo fueron células de ganglio de animales inmunizados con las formulaciones mencionadas y estimuladas con la Proteína Q. Como control de este experimento se emplearon células de ganglio de ratones del grupo control salino infectados con *L. major* y estimuladas con la PQ. El procedimiento a seguir fue el mismo que se utilizó en la determinación de la variabilidad del repertorio CDR3 en animales vacunados descrito en materiales y métodos.

Todos los espectratipos de las 24 familias correspondientes a cada uno de los animales analizados en este estudio pueden ser consultados en el anexo 2.

Como se comentó en los resultados obtenidos para el perfil de CDR3 en ratones vacunados, las familias V β 3.1, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 11, V β 17, V β 19 y V β 20 no fueron analizadas debido a su baja expresión y a la distorsión observada en los espectratipos.

El análisis visual revela que, en algunas familias, existe un patrón en los espectratipos asociado al retraso en la aparición de las lesiones. En el caso de los animales inmunizados con QCpG que retrasan la inflamación (QCpG R) se encuentran similitudes en la familia V β 4 y V β 6. En los animales inmunizados con la formulación pcDNA3Q+QCpG que retrasan la inflamación (pcDNA3Q+QCpG R) las familias donde se observa el mismo efecto son la V β 8.3 y V β 14. Como ejemplo de ello, en la figura 4.20 se muestran los espectratipos correspondientes a la familia V β 6 (QCpG, panel A) y V β 8.3 (pcDNA3Q+QCpG, panel B).

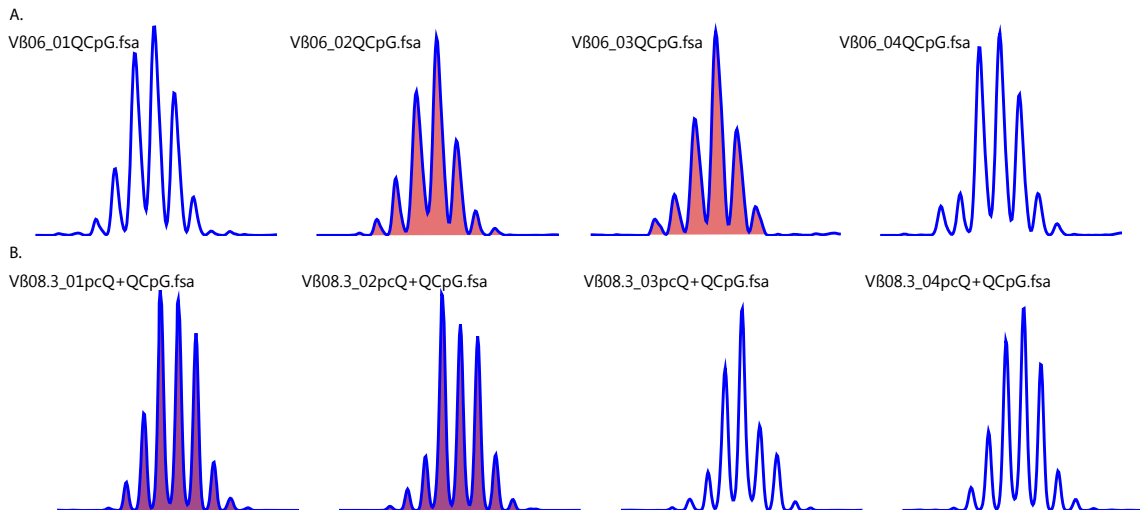


Figura 4.20. Patrones de espectratipos asociados a retraso en la inflamación. Las células de ganglio de los animales infectados que previamente se inmunizaron con las formulaciones QCpG y pcDNA3Q+QCpG fueron estimuladas con la PQ. El segmento V β del TCR fue amplificado por PCR. Los productos de las reacciones fueron separados en un secuenciador automático y analizados con el programa Peak Scanner. Los espectratipos mostrados corresponden al perfil de CDR3 de la familia V β 6 (Panel A, QCpG) y V β 8.3 (Panel B, pcDNA3Q+QCpG). Las similitudes en los espectratipos de los animales que retrasan la aparición de la inflamación se resalta en color.

El análisis posterior de los datos, mediante el programa ISEA peaks, reveló que para los animales inmunizados con la formulación QCpG los valores de perturbación mayores de 15% se encuentran en las familias V β 2, V β 8.2, V β 9, V β 12, V β 13, V β 16 y V β 18 (Figura 4.21). Al comparar los valores de perturbación de estas familias entre los animales QCpG que no retrasan la aparición de la inflamación (QCpG NR) y aquellos que la retrasan (QCpG R), se encontró que los animales QCpG NR presentan mayores valores de perturbación en cinco de las siete familias (V β 8.2, V β 9, V β 13, V β 16 y V β 18). Por otra parte, los animales QCpG R presentan mayores valores en la perturbación para las familias V β 2 y V β 12 y además la familia V β 7 se perturba sólo en estos animales (Figura 4.21).

En el grupo de los animales inmunizados con la formulación pcDNA3Q+QCpG, se encontró que las familias con mayores valores de perturbación son la V β 8.2, V β 9, V β 12, V β 13, V β 16 y V β 18 (Figura 4.22). La comparación de las perturbaciones entre los animales que retrasan o no la inflamación permite determinar que los animales pcDNA3Q+QCpG NR presentan mayores valores en la perturbación para las familias V β 9, V β 13 y V β 18. La familia V β 12 presenta un porcentaje de perturbación mayor en los animales pcDNA3Q+QCpG R. También se encontraron valores de perturbación por encima del 15% en la familia V β 2 sólo en estos animales. Estas observaciones coinciden con los datos obtenidos para estas dos familias en el grupo QCpG.

En general los datos podrían sugerir que los ratones que no logran retrasar la aparición de las lesiones, en los dos grupos analizados, muestran valores mayores de perturbación en las familias V β 9, V β 13 y V β 18.

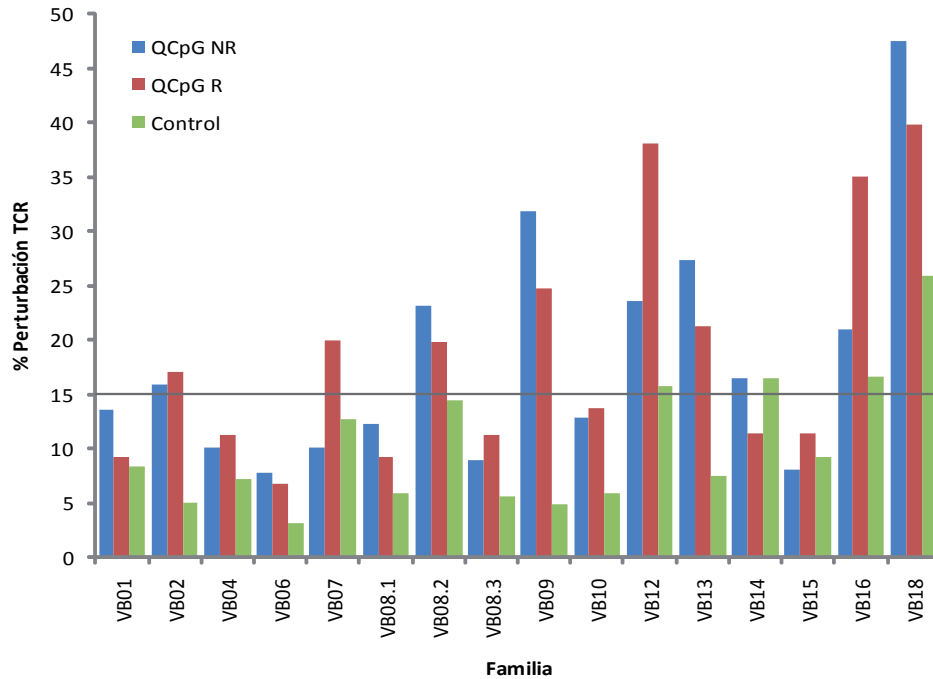


Figura 4.21. Diversidad del repertorio Vβ CDR3 en ratones QCpG. La diversidad del repertorio CDR3 se determinó mediante el cálculo de la perturbación media para cada familia. Se analizó la diversidad del repertorio Vβ CDR3 en células de ganglio de ratones inmunizados con QCpG y posteriormente infectados, estimulados con la Proteína Q. Las familias con una perturbación igual o mayor al 15% presentan cambios significativos y son consideradas de interés para el análisis.

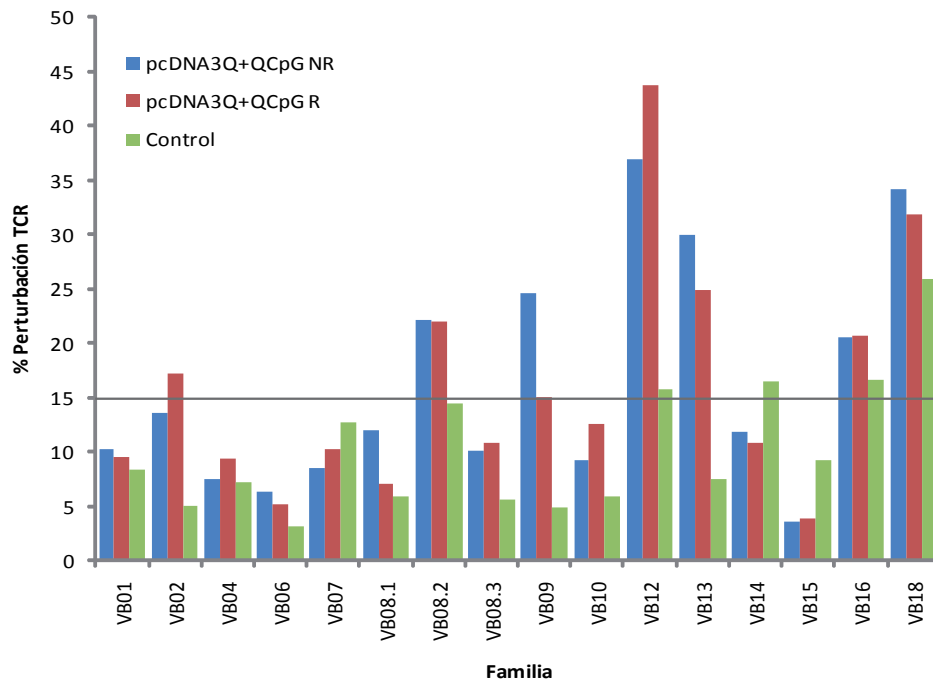


Figura 4.22. Diversidad del repertorio Vβ CDR3 en ratones pcDNA3Q+QCpG. Se analizó la diversidad del repertorio Vβ CDR3 en células de ganglio de ratones inmunizados con pcDNA3Q+QCpG y posteriormente infectados, estimulados con la Proteína Q. Las familias con una perturbación igual o mayor al 15% fueron consideradas de interés en el análisis.

Para fortalecer estas observaciones, se utilizó el algoritmo de agrupamiento por medias k (*k-means clustering*). Se puede observar cómo las muestras se agrupan en dos sectores diferentes A y B (Figura 4.23). El grupo A está formado por los animales vacunados que no logran retrasar la aparición de la inflamación, (excepto el QCpG4). En el grupo B se encuentran todos los animales que lograron retrasar la aparición de las lesiones. Esto es un claro indicio de cómo, de acuerdo con los datos obtenidos para los perfiles de TCR, se logra encontrar a este nivel un patrón de asociación entre los perfiles de los animales que logran retrasar la inflamación de los que desarrollan la enfermedad.

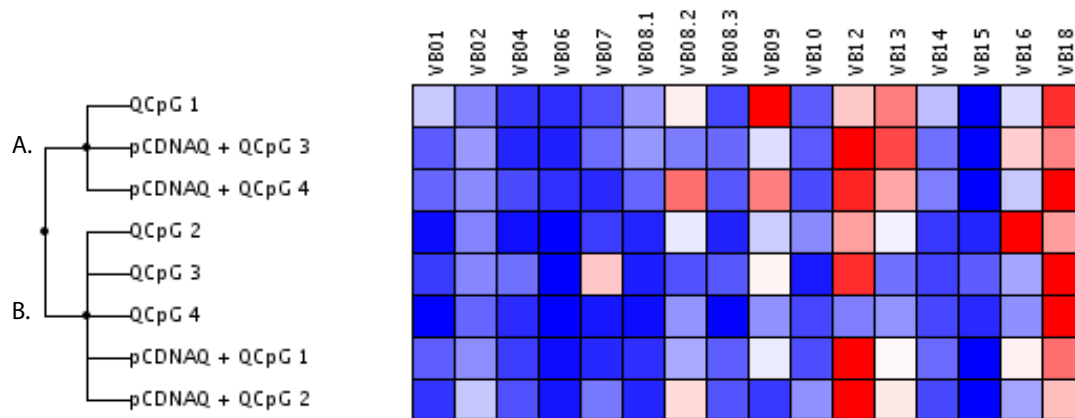


Figura 4.23. Algoritmo de agrupamiento por medias k . El repertorio $V\beta$ de las células de los animales vacunados y posteriormente infectados con *L. major* fue agrupada por "*k-means clustering*". La agrupación permite observar dos grupos bien definidos. A: Animales que no logran retrasar la aparición de las inflamaciones. B: Animales que logran un retraso en la aparición de las lesiones. Los tonos rojos resaltan las familias que presentan un porcentaje mayor de 15 en la perturbación.

DISCUSIÓN

5. Discusión

En el presente trabajo se analizó la capacidad antigénica y la respuesta inmune generada por la Proteína Q (Soto, Requena et al. 1998), frente al reto experimental con *L. major*, en un modelo susceptible a la infección como es el ratón BALB/c. Para ello, se exploraron diferentes alternativas de formulación expresadas en forma de proteína recombinante o como vacuna de ADN, pues diversos estudios han demostrado que es posible emplear este tipo de vacunas para prevenir y/o modular la respuesta frente a *Leishmania* (Campos-Neto, Webb et al. 2002; Iborra, Soto et al. 2003; Tapia, Perez-Jimenez et al. 2003; Ahmed, Bahloul et al. 2004).

La Proteína Q fue elegida para este estudio ya que estudios previos han demostrado que es fuertemente reconocida por sueros de perros infectados con *L. infantum* (Soto, Requena et al. 1998). Estudios posteriores en diferentes modelos animales han demostrado su potencial como molécula inmunogénica capaz de inducir protección frente a la infección causada por *L. infantum* (Molano, Alonso et al. 2003; Parody, Soto et al. 2004; Carcelen, Iniesta et al. 2009). Sin embargo, no se ha determinado el uso potencial como candidato a una vacuna contra *L. major*. Teniendo en cuenta que uno de los requisitos de una vacuna “ideal” contra la leishmaniasis es que sea eficaz contra el mayor número de especies de *Leishmania* (Reed, Coler et al. 2003), se hace importante establecer las propiedades inmunogénicas y la capacidad protectora frente a *L. major*.

A la hora de evaluar la eficacia de una vacuna no sólo es necesario estudiar el componente antigénico sino el de los adyuvantes dado que juegan un papel fundamental en la estimulación del sistema inmune. En este trabajo se usaron los ODNs con motivos CpG considerados potentes activadores del sistema inmune capaces de incrementar la respuesta Th1 antígeno-específica (Liu, Luo et al. 2011).

Los estudios en ratón permiten describir los mecanismos inmunes involucrados en la respuesta frente a *Leishmania*. Como se describió en la introducción, muchas de las cepas de ratones como C57BL/6, CBAJ y CH3 son resistentes y se curan dentro de los pocos meses siguientes a la infección. Por el contrario, la cepa de ratones BALB/c es susceptible a la infección por *L. major*. En estos animales, se manifiesta una leishmaniasis cutánea con presencia de lesiones no cicatrizantes acompañadas de una rápida diseminación sistémica que puede conducir a la muerte (Liese, Schleicher et al. 2008). La resistencia y susceptibilidad están relacionadas con el desarrollo de respuestas Th1 ó Th2, respectivamente. Los ratones C57BL/6 montan una respuesta temprana de tipo Th1 y previenen el crecimiento del parásito en el lugar de la lesión. Las cepas susceptibles (BALB/c) montan una respuesta de tipo Th2 que resulta en la progresión de la enfermedad. En el presente trabajo se emplearon ratones BALB/c, con el fin de valorar la capacidad antigénica e inmunoprotectora de la PQ, frente a *L. major*.

Las vacunas han sido administradas con un carácter profiláctico para reducir la susceptibilidad del hospedero frente a la infección (Klinman, Currie et al. 2004). Deben contener inmunógenos capaces de generar respuestas de memoria, para que los antígenos del parásito durante las primeras etapas de la infección susciten una respuesta inmediata. Estos mecanismos servirían para la neutralización inmediata del patógeno tras la infección o para la destrucción de las células infectadas (Schijns 2003).

Como se mencionó con anterioridad, la Proteína Q es una molécula formada por cuatro determinantes antigénicos (LiH2A, LiP2b, LiP2a y LiP0) derivados de proteínas intracelulares de *L. infantum* que, a pesar de su elevado grado de conservación, son capaces de generar una respuesta inmunológica en los hospedadores durante la infección. Se ha descrito que la respuesta humoral frente a estos y otros antígenos, ocasionalmente es de fuerte intensidad, resulta no protectora y se correlaciona con algunas de las alteraciones patológicas propias de la leishmaniasis (hipergammaglobulinemia, deposición de complejos inmunes, activación policlonal de células B). Chang y cols (Chang and McGwire 2002; Chang, Reed et al. 2003) han propuesto un modelo que asigna el origen de la virulencia del parásito a un grupo determinado de moléculas constituido principalmente por proteínas internas altamente conservadas (dentro de las que se encuentran las cuatro que conforman la PQ), a las que denominan “patoantígenos”. La interacción incontrolada de estas proteínas internas con el sistema inmune del hospedador son el origen y el principal factor de desarrollo de la patología.

Sin embargo y en contradicción a lo expuesto anteriormente, diversos estudios han demostrado que el uso de estos antígenos internos, a pesar de generar respuestas de tipo Th2 pueden redirigir la respuesta hacia una de tipo Th1 e inducir protección si son usados con los adyuvantes adecuados (revisado por Campos-Neto 2005) o en algunos casos sin adyuvante. En el caso concreto de la PQ, los estudios previos han demostrado que promueve la protección frente a *L. infantum* en ratones, cuando es adyuvada con CpG (Parody, Soto et al. 2004) y en el modelo canino adyuvada con BCG (Molano, Alonso et al. 2003) o sin adyuvante (Carcelen, Iniesta et al. 2009).

Estos estudios han demostrado que la PQ es una molécula altamente inmunogénica capaz de generar respuestas de memoria. Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran estos datos. Las cinco formulaciones de la Q generaron en los ratones inmunizados, respuestas de tipo primario y secundario, asociadas a la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG, respectivamente. Además, se encontró que la respuesta inmune producida frente a la Proteína Q es dirigida principalmente por los determinantes antigénicos LiP2b y LiP2a, lo cual se correlaciona con lo descrito por Parody y cols. (Parody, Soto et al. 2004).

Los datos presentados sugieren que la PQ, así como los dos determinantes antigénicos LiP2b y LiP2a, son inmunogénicos e inducen una respuesta humoral cuando son administrados por vía s.c. en la almohadilla plantar de los ratones BALB/c. La presencia de anticuerpos de tipo IgG2a e IgG1 se consideran indicadores de una respuesta de tipo Th1 y Th2, respectivamente. El predominio de anticuerpos IgG1 en la mayoría de las formulaciones haría suponer que la respuesta generada es más de tipo Th2. Esto se correlaciona con la presencia de IL-10 e IL-3 en los sobrenadantes de cultivo de las células del ganglio y bazo estimuladas con la PQ y por la presencia de IL-10, específica para LiP2b y LiP2a, en células de bazo.

A pesar de ello, en los animales inmunizados con la formulación QCpG, se observa un sutil cambio en la razón IgG2a/IgG1, encontrándose niveles ligeramente superiores de IgG2a frente a la Q. Algo similar ocurre con los determinantes antigénicos (LiP2a y LiP2b), donde la razón IgG2a/IgG1 es de 1,7 y 1,9, respectivamente. Este hecho, demuestra el potencial inmunorregulador del adyuvante y sugiere que la PQ también está induciendo una respuesta de tipo Th1. Estas observaciones pueden estar apoyadas por la detección de altos niveles IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo y en

las células del ganglio y bazo estimuladas con la PQ. Del mismo modo, se encontró IFN- γ específico para Lip2b y Lip2a en células de bazo. Se sabe que la presencia de IFN- γ , es crucial para el control y la resolución de la infección (Castellano, Filho et al. 2009). Por ello, se considera importante encontrar que la PQ está estimulando la producción de esta citoquina en los animales inmunizados.

La capacidad de modular la respuesta inmune por parte de los CpGs ha sido ampliamente demostrada no sólo frente enfermedades parasitarias sino en otras patologías. Algunos de estos trabajos describen cómo antígenos que generan una respuesta inmune de tipo Th2 logran, por acción del adyuvante, suscitar una respuesta de tipo Th1 (Iborra, Parody et al. 2008; Ramirez, Iborra et al. 2010; Sanchez, Pitkowski et al. 2011). Los datos obtenidos en el presente estudio, podrían sugerir que a pesar de que el adyuvante está logrando inducir una respuesta de tipo Th1, su efecto no es suficiente para disminuir la respuesta Th2 generada por los antígenos. Esto concuerda con algunos estudios que ponen en evidencia que el uso de los CpGs no logra suprimir la respuesta Th2, generada por algunos antígenos (Iborra, Abanades et al. 2007; Wu, Weigand et al. 2009) y en particular contra la generada por la Lip2a y Lip2b.

La administración de vacunas en forma de ADN, es una estrategia ampliamente utilizada para promover respuestas de tipo Th1 (Carvalho, Rodgers et al. 2010). En este caso y una vez comprobada la expresión de la PQ en células COS-7, se encontró que la inmunización de la PQ en forma de vacuna de ADN y el régimen “*prime-boost*”, no lograron revertir la respuesta hacia una de tipo Th1. Los animales inmunizados con estas formulaciones inducen los dos tipos de respuesta; Th1 asociada a la producción de IFN- γ y Th2 que genera la producción de IL-10 e IL-13. Esta dicotomía en la respuesta ha sido observada también en otras vacunas de ADN probadas contra *Leishmania* (Abdian, Gholami et al. 2011; Mazumder, Maji et al. 2011) y contra algunas enfermedades autoinmunes (Song, Liang et al. 2009).

En el campo de la investigación en *Leishmania*, un ejemplo bien estudiado de células T específicas contra el parásito son las TCD4⁺ Va8⁺VB4⁺, que reconocen el antígeno LACK. Estas células son capaces de producir altos niveles de IL-4 en una etapa temprana de la infección e instruir el desarrollo de una respuesta Th2 en ratones susceptibles BALB/c (Reiner, Wang et al. 1993; Launois, Maillard et al. 1997). La identificación de estas poblaciones facilita la comprensión de la susceptibilidad y/o resistencia a la infección por *L. major*. Sin embargo, en la actualidad hay poca información sobre los repertorios TCR en las células T específicas para *Leishmania* y ampliar este conocimiento facilitaría el desarrollo de una vacuna efectiva contra el parásito.

En el presente trabajo, se encontró que los cambios en la respuesta inmune generada tras la inoculación con cada formulación podrían ser un indicio de que los animales están respondiendo de manera diferente frente al mismo antígeno. Por este motivo se decidió analizar el segmento CDR3V β del TCR, con el fin de determinar diferencias en la respuesta inmune entre los animales inmunizados con la PQ recombinante y como vacuna de ADN.

Cuando se realizan estudios del TCR se observa que algunas poblaciones linfocitarias pueden ser expandidas o disminuidas por efecto del antígeno. Este hecho genera variaciones en poblaciones celulares con una longitud de CDR3 específica, modificando su perturbación y por consiguiente el perfil del espectratipo (Gorochov, Neumann et al. 1998).

La revisión de los espectratipos permitió encontrar que el repertorio TCR en bazo de los animales control conserva una distribución Gaussiana, de acuerdo a lo descrito por Pannetier y cols. (Pannetier, Cochet et al. 1993). Esta distribución no se ve alterada por la adición de medio a las células en cultivo. También se pudo determinar que los perfiles de espectratipos de los animales inmunizados presentan alteraciones en dicha distribución después de estimular las células con la PQ. Se observó además que estos cambios pueden corresponder a expansiones oligoclonales, que se caracterizan por la presencia de varios picos en los espectratipos (Miqueu, Guillet et al. 2007).

En los animales inmunizados (Q y pcDNA3Q) se observó que la estimulación de esplenocitos, con la PQ induce cambios en el repertorio de las células T, caracterizados por expansiones oligoclonales. El análisis cuantitativo de los datos permitió establecer diferencias entre los dos grupos de animales inmunizados; se encontró que los ratones vacunados con pcDNA3Q presentan una mayor perturbación global del repertorio, con respecto a los animales inmunizados con la Q. Una hipótesis para explicar este hecho es que la vacuna de ADN posee motivos CpG dentro de su secuencia, que potencian la respuesta inmune innata y adaptativa. La estimulación de las células del sistema inmune por parte de estos motivos CpG estaría induciendo cambios profundos en el repertorio de los animales inmunizados con pcDNA3Q, que no se suscitan cuando se inmuniza con la PQ recombinante. Esto explicaría también, por qué las familias V β 2, V β 7 y V β 10 de los animales inmunizados con pcDNA3Q, presentan valores de perturbación mayores del 15%.

Se encontró una similitud entre los dos grupos de animales inmunizados. La estimulación *in vitro* con la Q está induciendo cambios significativos (porcentaje de perturbación mayor de 15) en las poblaciones celulares T V β 9, V β 12, V β 16 y V β 18. Esto podría sugerir que estas células están involucradas en la respuesta inmune inicial frente a la Q. La idea puede ser apoyada por los hallazgos hechos por Clarêncio y cols (Clarencio, de Oliveira et al. 2006), donde se describe un incremento en la expresión de las familias V β 12 y V β 16 en las células CD8⁺ de pacientes con leishmaniasis.

Otra observación encontrada tras estos análisis, es que ratones con el mismo fondo genético responden con repertorios diferentes de TCR frente al mismo antígeno. Los perfiles de los espectratipos y los cálculos obtenidos mediante el análisis matemático así lo confirman. Los trabajos previos realizados en ratones C57BL/6 infectados con el virus de la coriomeningitis, permiten apoyar esta idea (Lin and Welsh 1998). El trabajo citado describe que el repertorio de TCR varía de un ratón a otro cuando se infectan con la misma dosis de virus, lo cual genera perfiles de espectratipos diferentes en ratones con el mismo fondo genético. Otra razón que puede aclarar este hecho, puede ser atribuida a la existencia del repertorio de TCR público y privado. Un estudio realizado con ratones BALB/c inmunizados con lisozima de huevo describe como el repertorio generado contra el péptido inmunodominante resulta de la superposición de dos tipos de respuestas: la pública que es compartida y altamente reproducible en animales individuales y una respuesta privada caracterizada por la aparición de nuevos clones de células T que difieren entre individuos. Con frecuencia las cadenas β de los TCR del repertorio privado comparten homología de secuencia con la región CDR3 β del repertorio público, pero generalmente emplean segmentos V β y J β diferentes. Es posible que los clones privados tengan baja afinidad/avidez y los clones públicos alta afinidad/avidez por el péptido (Cibotti, Cabaniols et al. 1994).

Una vez analizada la respuesta inmune generada tras la inmunización de los animales, se decidió analizar si este tipo de respuestas confieren inmunidad frente a la infección por *L. major*. Para ello ratones BALB/c, susceptibles a la infección, previamente inmunizados con las cinco formulaciones, se inocularon con una dosis de 5×10^4 promastigotes en la almohadilla plantar. Se encontró que los animales inmunizados con las formulaciones Q, pcDNA3Q, y pcDNA3Q+Q desarrollaron una inflamación que aumenta de forma progresiva, similar a los controles. Para los ratones inmunizados con las formulaciones QCpG y pcDNA3Q+QCpG se observó que el 50% de los animales presentaban un retraso en la evolución de la inflamación y de las lesiones al compararlas con el grupo control. Sin embargo, estos ratones no lograron controlar la infección y desarrollaron LC, por lo que se puede decir que la protección observada es sólo de carácter parcial. Para confirmar este dato, se realizó el análisis de la carga parasitaria en bazo y ganglio poplíteo de los ratones infectados. Se pudo encontrar que aquellos animales que presentaron un retraso en la aparición de las lesiones mostraron un descenso en la carga parasitaria del bazo.

A pesar de la evidencia de que la Proteína Q genera una respuesta Th1 después de la infección, ya que los niveles de IFN- γ e iNOS específicos para SLA fueron superiores al control, no se observa una protección eficaz en los animales infectados. Esta falta de protección podría estar relacionada con la inducción de una respuesta mixta generada frente a la Q en todos los grupos de animales inmunizados. Se ha sugerido que la inducción de una respuesta Th2 simultánea con una de tipo Th1 puede eliminar la función protectora de la segunda (Sjolander, Baldwin et al. 1998; Iborra, Soto et al. 2003; Iborra, Abanades et al. 2007), en este modelo de infección. De hecho, los niveles de IL-4, IL-13 e IgG1 en respuesta a los antígenos del parásito (SLA) podrían sugerir que la sensibilización previa con la PQ está induciendo su incremento frente al parásito. Este aumento en los niveles de citoquinas Th2 estaría disminuyendo la actividad protectora del IFN- γ e iNOS, así como la actividad estimuladora de la IL-12. Un estudio realizado en ratones resistentes C57BL/6, demuestra que la sobreexpresión de IL-13 genera susceptibilidad frente a la infección por *L. major*. Los autores atribuyen la pérdida de la resistencia a la supresión de la IL-12 y el IFN- γ . En este mismo trabajo también se demostró que ratones BALB/c deficientes en la expresión de IL-4, IL-13 ó ambas son resistentes a la infección (Matthews, Emson et al. 2000). También se ha descrito, que la generación de una respuesta inmune protectora implica la supresión de citoquinas Th2 como la IL-4 e IL-13 (Anderson, Mendez et al. 2005).

Otra explicación a la falta de protección, es que la respuesta del IFN- γ esté bloqueada por efecto de la producción de IL-10 frente a la Q. Después de la inmunización se encontró que la PQ induce la producción de IFN- γ ; paralelo a ello también se encontraron niveles específicos de IL-10. Diversas evidencias han demostrado que la IL-10 es una de las principales citoquinas responsables de la susceptibilidad del ratón a las infecciones con *Leishmania*. Esta citoquina bloquea la actividad leishmanicida del macrófago limitando su capacidad de responder a las señales de activación, generadas por el IFN- γ (Nylen and Akuffo 2009). Recientemente, se ha demostrado además, que la IL-10 producida por células B, en respuesta *L. major* juega un rol importante en el desarrollo de la susceptibilidad a la infección (Ronet, Hauyon-La Torre et al. 2010). No obstante, se ha descrito que células Th1 productoras de IFN- γ , están implicadas en la producción de IL-10 como mecanismo de control (Anderson, Oukka et al. 2007).

Para que una respuesta inmune sea eficaz contra *Leishmania*, se requiere de la presencia de células Th1 capaces de producir simultáneamente IFN- γ , TNF- α e IL-2, estas células son clasificadas como “células efectoras de memoria” que generan una respuesta de “calidad” (Darrah, Patel et al. 2007). Los datos mostrados en el presente trabajo no permiten determinar si los ratones inmunizados e infectados están generando este tipo de células protectoras. Sin embargo, se sugiere que las células Th1 de estos animales infectados, a pesar de estar produciendo IFN- γ , son menos eficientes a la hora de eliminar el parásito. No obstante, se considera que el potencial de Q como subunidad para desarrollar una vacuna contra *L. major* no debe ser descartado ya que de las cinco formulaciones probadas dos generaron un retraso en la aparición de las inflamaciones, en el 50% de la población.

Un trabajo reciente demostró que el esquema de vacunación, la cantidad de antígeno suministrado y la elección del adyuvante influyen sobre los niveles de la IL-10 y estos a su vez, repercuten sobre las células T CD4⁺ y células CPA para inducir una respuesta Th1 con capacidad protectora (Darrah, Hegde et al. 2010). Los autores probaron dos formas de administración de la misma vacuna: la MML (también conocida como Leish-111f) adyuvada con ADV (adenovirus) o con CpG. Encontraron cómo después de administrar MML-ADV hay un aumento dosis dependiente de IL-10 por parte de los linfocitos T CD4⁺ y las CPA, sin embargo las células derivadas de esta adaptación no lograron inducir protección. Por el contrario, la inhibición innata de la IL-10 producida por las CPA al inmunizar con MML-CpG mejora significativamente la magnitud de la respuesta y el grado de polarización hacia Th1, lo cual se ve reflejado en un aumento de la protección. Estos datos demuestran como la IL-10 puede manipularse para conseguir una respuesta Th1 de calidad que genere protección, dependiendo de la elección del adyuvante y la forma de administrar la vacuna (Darrah, Hegde et al. 2010).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo harían suponer que los ratones QCpG R y pcDNA3Q+QCpG R están generando una respuesta similar a la descrita por Darrah y cols. Sin embargo, no se logra inducir una respuesta de “calidad” que proteja a todos los animales. Estos datos, abren posibilidades para ensayar otros esquemas de inmunización, así como valorar la concentración y número de dosis a utilizar. Todo ello, con el fin de generar un efecto protector en el 100% de la población analizada. La evidencia previa y los datos encontrados con este trabajo también sugieren que la elección del adyuvante CpG, fue adecuada. Sería oportuno realizar experimentos administrando diferentes cantidades del inmunógeno.

Por otra parte, se podría pensar que el modelo de LC empleado en el presente estudio no es el más cercano a la transmisión del parásito. Por una parte, la dosis infectiva empleada es de 5×10^4 , considerablemente superior al número de parásitos que el insecto inocula (cada picadura introduce una media de 100-1000 parásitos altamente enriquecidos en promastigotes metacíclicos) (Mougneau, Bihl et al. 2011). Por otra parte, se considera que la inoculación en la almohadilla plantar es de tipo subcutáneo, mientras que el insecto inocula el parásito a nivel intradérmico. Finalmente, en los ratones BALB/c la inflamación es progresiva y observa la presencia de parásitos en el bazo, lo que no ocurre en las infecciones por *L. major* en humanos. Esto permite plantear que el potencial de la PQ, como vacuna contra *L. major*, debe ser probado también en el modelo resistente C57BL/6. Este modelo descrito por Belkaid y cols. (Belkaid, Kamhawi et al. 1998), se ajusta de un modo más preciso a la transmisión natural en humanos, ya que consiste en la inoculación intradérmica en la oreja de 100-1000 promastigotes metacíclicos. Las lesiones son similares a las observadas en hu-

manos y disminuyen progresivamente en concordancia con la reducción del número de parásitos.

La leishmaniasis es una enfermedad que tiene muchas posibilidades de ser controlada con una vacuna, debido a que la recuperación primaria de una infección hace que el hospedero, en la mayoría de los casos se vuelva resistente a las infecciones posteriores. Surge entonces la pregunta: ¿Se requiere la persistencia del parásito para tener una inmunidad protectora? Algunos estudios en ratón han demostrado que la persistencia del parásito se requiere para el mantenimiento de una inmunidad protectora medida por células T y la completa eliminación del parásito conduce a la pérdida de dicha inmunidad (Belkaid, Hoffmann et al. 2001; Belkaid, Piccirillo et al. 2002). Según el panorama se podría plantear que la vacunación con parásitos atenuados sería una de las alternativas a seguir para prevenir la enfermedad. Diferentes mecanismos para atenuar el parásito han sido empleados, pero los más utilizados últimamente son deleciones de genes esenciales para virulencia. Un estudio reciente con una cepa de *L. donovani* deficiente para el gen de la centrina demostró que la inoculación con estos parásitos puede inducir protección contra el reto homólogo y heterólogo en ratones BALB/c (Selvapandiyan, Dey et al. 2009). Sin embargo, la posibilidad de que estas mutaciones reviertan dificulta que las agencias regulatorias permitan por ahora su utilización en humanos. Otra vertiente plantea que el mantenimiento de las células T de memoria no requiere la presencia del parásito y que se puede desarrollar una inmunidad protectora a largo plazo (Zaph, Uzonna et al. 2004). Todo ello demuestra que la respuesta inmune frente a *Leishmania* es muy compleja y las vacunas probadas hasta el momento no logran un grado de protección que sea satisfactorio. Por otra parte, es importante resaltar que la mayoría de los estudios de protección frente a leishmaniasis han sido realizados en ratones y algunos en perro, sin embargo el conocimiento de los mecanismos acerca de cómo se produce la respuesta en cada modelo aún no es completamente clara y permite cuestionar si estos hallazgos puedan ser extrapolables para el diseño de una vacuna contra las leishmaniasis humanas (Kedzierski 2010).

Para finalizar, se analizó la existencia de parámetros asociados con el retraso en la aparición de la inflamación ó progresión de la infección a nivel del TCR. Para ello se determinó la diferencia entre el repertorio TCR de los animales que presentan un retraso en la aparición de las lesiones respecto a los que desarrollan la enfermedad. Los datos encontrados permiten señalar que tras la infección y posterior estimulación con la Q, el repertorio TCR de los animales inmunizados así como del grupo control cambia. Las expansiones presentadas por los espectratipos posiblemente sean de carácter oligoclonal.

Los mayores cambios en los valores de perturbación, para los dos grupos (QCpG y pcDNA3Q+QCpG), se observaron en las familias V β 2, V β 8.2, V β 9, V β 12, V β 13 V β 16 y V β 18. Al comparar estos datos con los obtenidos después de la inmunización se encontró que las familias V β 9, V β 12, V β 16 y V β 18 también presentan los mayores valores de perturbación. Esto podría sugerir que estas cuatro poblaciones están fuertemente involucradas en la generación de una respuesta inmune frente a la Q y por ende frente al parásito.

Las causas de la variación de estas poblaciones celulares en *Leishmania* y otras enfermedades parasitarias o infecciosas todavía no están esclarecidas. No obstante, se encontró que el incremento de células T V β 8.1 y V β 8.2 se asocia a la susceptibilidad de ratones B10.D2 con malaria cerebral (Boubou, Collette et al. 1999). Por otra parte, se ha descrito que la supresión de células T V β 4 y V β 6 induce

mayor protección en ratones C57BL/6 frente a la infección con *Histoplasma capsulatum* (Gomez, Woodward et al. 2001). En pacientes con enfermedad de Chagas se encontró que células estimuladas *in vitro* con epimastogotes y tripomastigotes expresan una alta frecuencia de poblaciones TV β 5 (Costa, Gollob et al. 2000).

Otro aspecto interesante fue encontrar que la familia V β 2 presentó un cambio importante en los animales inmunizados con pcDNA3Q. Curiosamente, tras la infección esta misma familia mostró cambios significativos en su población tanto para los animales inmunizados con QCpG como para los pcDNA3Q+QCpG R. ¿Podrían los motivos CpGs estar directamente implicados en la estimulación de esta población en particular? La respuesta inicial podría ser afirmativa. Ensayos posteriores encaminados a determinar los epítomos reconocidos por estas células permitirían confirmar esta idea.

Por otra parte, el análisis de los resultados también permitió encontrar un patrón de diferenciación entre los animales que logran un retraso en la aparición de la inflamación y los que no logran controlarla. Establecer qué poblaciones celulares están involucradas en el retraso de la inflamación sería insuficiente con los datos obtenidos hasta ahora ya que no se puede determinar las células involucradas en la producción de una respuesta inmune de “calidad”. No obstante, lo que sí se pudo determinar es que las células T V β 2 y V β 12, de los animales QCpG R y pcDNA3Q+QCpG R están presentando mayores cambios en su población. Esto sugiere que dichas poblaciones, podrían estar involucradas en la generación de una respuesta inmune capaz de controlar al parásito. De forma interesante se puede destacar que un incremento en la expresión de células TV β 2 indica un posible papel de esta población en respuesta a la infección por hepatitis B (Dou, Wu et al. 1998).

También se observó que los valores de perturbación en algunas familias eran menores que los del grupo control (familia V β 14 y V β 15). Se ha encontrado que el repertorio TCR puede ser continuamente seleccionado en presencia de un exceso de antígenos virales conduciendo a la persistencia de la infección (Lin and Welsh 1998). En este caso, el incontrolado número de parásitos presentes en el ganglio podrían estar generando una selección del repertorio. Esta selección podría inducir una mayor alteración en la población TV β 14 y V β 15 de los animales control, la cual no se observa en los animales inmunizados.

Los datos aquí presentados contribuyen a ampliar el panorama acerca de las poblaciones celulares involucradas en el desarrollo de una respuesta inmune frente a *Leishmania*. Además el estudio de la diversidad del TCR para determinar respuestas T antígeno-específicas es una herramienta importante para el diseño y desarrollo racional de vacunas.

Generar una vacuna contra la leishmaniasis es posible, a la fecha muchas de ellas se han probado pero sólo una está en fase I de experimentación, en humanos. Es por ello que se hace importante seguir investigando para poder encontrar otras posibles vacunas, que tengan la capacidad de generar una respuesta inmune robusta frente a más de una especie de *Leishmania*.

En general se puede decir que la Proteína Q posee un fuerte potencial inmunogénico, lo cual permite que pueda ser considerado como un buen candidato a vacuna contra *L. major*. Los estudios realizados en el presente trabajo permiten sugerir que, aunque la PQ no haya inducido una respuesta inmune de “calidad”, su capacidad inmunogénica puede ser manipulada para desarrollar una respuesta eficaz. Esta idea puede ser apoyada por los datos mostrados en los dos grupos de

animales que presentaron un retraso en la aparición de la inflamación. Estos resultados más que permitir sacar conclusiones sobre el papel de la Q frente a la infección por *L. major*, abren nuevas posibilidades de investigación. Dentro de ellas se puede considerar el probar la Q a otras dosis y ver su efecto inmunogénico y probar, además, la eficacia de la administración de PQ en un modelo resistente a la infección como es el ratón C57BL/6. Igualmente sería interesante determinar las poblaciones celulares que están involucradas en la generación de una respuesta inmune efectora en este modelo animal, por medio de inmunoscopia, comparar estas poblaciones celulares encontradas en ratones con las poblaciones celulares involucradas en la respuesta frente a *L. major* en humanos, con el fin de inducir su expansión.

El poder protector de la Q frente a las infecciones con *L. infantum* está establecido según describen trabajos previos realizados en el modelo animal de ratón (Parody 2004) y perro (Molano, Alonso et al. 2003; Carcelen, Iniesta et al. 2009). Creemos que los datos presentados en el presente trabajo inician una base firme de investigación que podría permitir llegar a desarrollar formulaciones apropiadas basadas en la proteína Q y otros antígenos, como agentes que permitan controlar la infección por *L. major*.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

La Proteína Q es una molécula altamente antigénica capaz de generar una respuesta inmune humoral, en el ratón, aún en ausencia de adyuvante.

Los determinantes inmunogénicos de la Proteína Q que están dirigiendo la respuesta hacia la proteína son preferentemente debidos a los fragmentos de la LiP2b y LiP2a.

La administración de la Proteína Q sola, adyuvada con CpGs, en forma de vacuna de ADN o en el régimen *“prime-boost”*, induce una respuesta inmune de tipo mixto en el modelo susceptible BALB/c. Esta respuesta mixta se caracteriza por la producción de IFN- γ , IL-10 e IL-13 por parte de los esplenocitos de los animales inmunizados.

La administración de la Proteína Q recombinante y en forma de vacuna de ADN, genera un cambio en el perfil TCR de los animales inmunizados.

Los animales inmunizados con pcDNA3Q presentan una mayor alteración en el repertorio TCR, si se compara con los animales inmunizados con la Q. Este hecho parece indicar que la inmunogenicidad a nivel del repertorio TCR es diferente si se administra una proteína como tal o en forma ADN.

La estimulación inmune mediante la administración de la Proteína Q induce cambios en las poblaciones celulares T V β 9, V β 12, V β 16 y V β 18. Estos cambios deben estar asociados a una respuesta antígeno-específica frente a la Q.

La vacunación con QCpG y pcDNA3Q+QCpG, genera un retraso en la aparición de la inflamación provocada por la infección en el 50% de los ratones infectados. Este retraso se asocia a la ausencia de parásitos en el bazo de los animales infectados.

Se encontraron perfiles de espectratipos similares, para algunas familias de TCR, en los animales que presentaron un retraso en la aparición de la inflamación.

Los cambios a nivel del repertorio TCR permiten diferenciar en dos grupos los animales que presentan un retraso en la aparición de la lesión, respecto a los que no logran controlarla desde el comienzo.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

Abdelhak, S., H. Louzir, J. Timm, L. Blel, Z. Benlasfar, M. Lagranderie, M. Gheorghiu, K. Dellagi y B. Gicquel (1995). "Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice." *Microbiology* 141 (Pt 7): 1585-1592.

Abdian, N., E. Gholami, F. Zahedifard, N. Safaee y S. Rafati (2011). "Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis." *Exp Parasitol* 127(3): 627-636.

Aga, E., D. M. Katschinski, G. van Zandbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Muller, W. Solbach y T. Laskay (2002). "Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*." *J Immunol* 169(2): 898-905.

Ahmed, S. B., C. Bahloul, C. Robbana, S. Askri y K. Dellagi (2004). "A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*." *Vaccine* 22(13-14): 1631-1639.

Akira, S. y H. Hemmi (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." *Immunol Lett* 85(2): 85-95.

Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley y D. L. Sacks (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector." *Science* 324(5924): 265-268.

Al-Hucheimi, S. N., B. A. Sultan y M. A. Al-Dhalimi (2009). "A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods." *Int J Dermatol* 48(4): 404-408.

Alarcon, J. B., G. W. Waine y D. P. McManus (1999). "DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents." *Adv Parasitol* 42: 343-410.

Alvar, J. (2001). "Las Leishmaniasis: De la Biología al control." 2ª Ed. Salamanca: Laboratorios Intervet

Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez y J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." *Clin Microbiol Rev* 21(2): 334-359, table of contents.

Anderson, C. F., S. Mendez y D. L. Sacks (2005). "Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice." *J Immunol* 174(5): 2934-2941.

Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo y D. Sacks (2007). "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." *J Exp Med* 204(2): 285-297.

Awasthi, A., R. K. Mathur y B. Saha (2004). "Immune response to *Leishmania* infection." *Indian J Med Res* 119(6): 238-258.

Banchereau, J. y R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252.

Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. Skeiky, L. R. Ellingsworth, D. R. Twardzik y S. G. Reed (1992). "Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism." *Science* 257(5069): 545-548.

Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado y A. Isibasi (2003). "*Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." *Mol Biochem Parasitol* 130(2): 65-74.

Belkaid, Y. (2008). "Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection." *Eur J Immunol* 38(4): 918-921.

Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn y D. L. Sacks (2001). "The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure." *J Exp Med* 194(10): 1497-1506.

Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro y D. L. Sacks (1998). "Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis." *J Exp Med* 188(10): 1941-1953.

Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach y D. L. Sacks (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." *Nature* 420(6915): 502-507.

Belkaid, Y., C. M. Sun y N. Bouladoux (2006). "Parasites and immunoregulatory T cells." *Curr Opin Immunol* 18(4): 406-412.

Belkaid, Y., E. Von Stebut, S. Mendez, R. Lira, E. Caler, S. Bertholet, M. C. Udey y D. Sacks (2002). "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." *J Immunol* 168(8): 3992-4000.

Bogdan, C. y M. Rollinghoff (1998). "The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion." *Int J Parasitol* 28(1): 121-134.

Boggild, A. K., B. M. Valencia, D. Espinosa, N. Veland, A. P. Ramos, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas y D. E. Low (2010). "Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis." *Clin Infect Dis* 50(1): e1-6.

Boubou, M. I., A. Collette, D. Voegtle, D. Mazier, P. A. Cazenave y S. Pied (1999). "T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria." *Int Immunol* 11(9): 1553-1562.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.

Braz, R. F., E. T. Nascimento, D. R. Martins, M. E. Wilson, R. D. Pearson, S. G. Reed y S. M. Jeronimo (2002). "The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection." *Am J Trop Med Hyg* 67(4): 344-348.

Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. Garin, N. Nassar y F. Derouin (1995). "Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice." *Antimicrob Agents Chemother* 39(9): 2167-2168.

Campos-Neto, A. (2005). "What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery?" *Braz J Med Biol Res* 38(7): 979-984.

Campos-Neto, A., J. R. Webb, K. Greeson, R. N. Coler, Y. A. Skeiky y S. G. Reed (2002). "Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice." *Infect Immun* 70(6): 2828-2836.

Carcelen, J., V. Iniesta, J. Fernandez-Cotrino, F. Serrano, J. C. Parejo, I. Corraliza, A. Gallardo-Soler, F. Maranon, M. Soto, C. Alonso y C. Gomez-Nieto (2009). "The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection." *Vaccine* 27(43): 5964-5973.

Carvalho, J. A., J. Rodgers, J. Atouguia, D. M. Prazeres y G. A. Monteiro (2010). "DNA vaccines: a rational design against parasitic diseases." *Expert Rev Vaccines* 9(2): 175-191.

Castellano, L. R., D. C. Filho, L. Argiro, H. Dessen, A. Prata, A. Dessen y V. Rodrigues (2009). "Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production." *Hum Immunol* 70(6): 383-390.

Chang, K. P. y B. S. McGwire (2002). "Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence." *Kinetoplastid Biol Dis* 1(1): 1.

Chang, K. P., S. G. Reed, B. S. McGwire y L. Soong (2003). "*Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity." *Acta Trop* 85(3): 375-390.

Chomarat, P. y J. Banchereau (1998). "Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies." *Int Rev Immunol* 17(1-4): 1-52.

Cibotti, R., J. P. Cabaniols, C. Pannetier, C. Delarbre, I. Vergnon, J. M. Kanellopoulos y P. Kourilsky (1994). "Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice." *J Exp Med* 180(3): 861-872.

Clarencio, J., C. I. de Oliveira, G. Bomfim, M. M. Pompeu, M. J. Teixeira, T. C. Barbosa, S. Souza-Neto, E. M. Carvalho, C. Brodskyn, A. Barral y M. Barral-Netto (2006). "Characterization of the T-cell receptor Vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites." *Infect Immun* 74(8): 4757-4765.

Clerici, M. y G. M. Shearer (1993). "A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection." *Immunol Today* 14(3): 107-111.

Collette, A., S. Bagot, M. E. Ferrandiz, P. A. Cazenave, A. Six y S. Pied (2004). "A profound alteration of blood TCRB repertoire allows prediction of cerebral malaria." *J Immunol* 173(7): 4568-4575.

Collette, A., P. A. Cazenave, S. Pied y A. Six (2003). "New methods and software tools for high throughput CDR3 spectratyping. Application to T lymphocyte repertoire modifications during experimental malaria." *J Immunol Methods* 278(1-2): 105-116.

Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. McMaster, B. R. Bloom y D. G. Russell (1993). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11473-11477.

Costa, R. P., K. J. Gollob, L. L. Fonseca, M. O. Rocha, A. C. Chaves, N. Medrano-Mercado, T. C. Araujo-Jorge, P. R. Antas, D. G. Colley, R. Correa-Oliveira, G. Gazzinelli, J. Carvalho-Parra y W. O. Dutra (2000). "T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells." *Scand J Immunol* 51(5): 511-519.

Couret, N., T. Lang, G. Milon y J. C. Antoine (2003). "Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice." *Int J Parasitol* 33(12): 1373-1383.

Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*." *Exp Mol Pathol* 72(2): 132-141.

Currier, J. R. y M. A. Robinson (2001). "Spectratype/immunoscope analysis of the expressed TCR repertoire." *Curr Protoc Immunol Chapter 10: Unit 10 28*.

Darrah, P. A., S. T. Hegde, D. T. Patel, R. W. Lindsay, L. Chen, M. Roederer y R. A. Seder (2010). "IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform." *J Exp Med* 207(7): 1421-1433.

Darrah, P. A., D. T. Patel, P. M. De Luca, R. W. Lindsay, D. F. Davey, B. J. Flynn, S. T. Hoff, P. Andersen, S. G. Reed, S. L. Morris, M. Roederer y R. A. Seder (2007). "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*." *Nat Med* 13(7): 843-850.

Davoudi, N., C. A. Tate, C. Warburton, A. Murray, F. Mahboudi y W. R. McMaster (2005). "Development of a recombinant *Leishmania major* strain sensitive to ganciclovir and 5-fluorocytosine for use as a live vaccine challenge in clinical trials." *Vaccine* 23(9): 1170-1177.

de Oliveira, C. I., I. P. Nascimento, A. Barral, M. Soto y M. Barral-Netto (2009). "Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis." *Parasitol Int* 58(4): 319-324.

Desjeux, P. y J. Alvar (2003). "Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe." *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1: 3-15.

Dou, H. Y., J. C. Wu, W. L. Peng, C. Chang, W. K. Chi, Y. D. Chu y C. P. Hu (1998). "Analysis of T cell receptor Vbeta gene usage during the course of disease in patients with chronic hepatitis B." *J Biomed Sci* 5(6): 428-434.

El-On, J. (2009). "Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis." *Isr Med Assoc J* 11(10): 623-628.

Englund, P. T. (1993). "The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors." *Annu Rev Biochem* 62: 121-138.

Garcia, K. C., L. Teyton y I. A. Wilson (1999). "Structural basis of T cell recognition." *Annu Rev Immunol* 17: 369-397.

Goldrath, A. W. y M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." *Nature* 402(6759): 255-262.

Gomez, F. J., E. O. Woodward, R. Pilcher-Roberts, R. S. Gibbons y G. S. Deepe, Jr. (2001). "V beta 6+ and V beta 4+ T cells exert cooperative activity in clearance of secondary infection with *Histoplasma capsulatum*." *J Immunol* 166(4): 2855-2862.

Gorochov, G., A. U. Neumann, A. Kereveur, C. Parizot, T. Li, C. Katlama, M. Karmochkine, G. Raguin, B. Autran y P. Debre (1998). "Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy." *Nat Med* 4(2): 215-221.

Gorski, J., M. Yassai, X. Zhu, B. Kissella, B. Kissella, C. Keever y N. Flomenberg (1994). "Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status." *J Immunol* 152(10): 5109-5119.

Goto, H. y J. A. Lindoso (2010). "Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." *Expert Rev Anti Infect Ther* 8(4): 419-433.

Goto, Y., A. Bhatia, V. S. Raman, H. Liang, R. Mohamath, A. F. Picone, S. E. Vidal, T. S. Vedvick, R. F. Howard y S. G. Reed (2011). "KSAC, the First Defined Polyprotein Vaccine Candidate for Visceral Leishmaniasis." *Clin Vaccine Immunol* 18(7): 1118-1124.

Grimaldi, G., Jr. y R. B. Tesh (1993). "Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research." *Clin Microbiol Rev* 6(3): 230-250.

Guerfali, F. Z., H. Ben-Abdallah, R. M. Sghaier, K. Ben-Aissa, G. Mkannez, H. Attia y D. Laouini (2009). "An in silico immunological approach for prediction of CD8+ T cell epitopes of *Leishmania major* proteins in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 murine models of infection." *Infect Genet Evol* 9(3): 344-350.

Gurunathan, S., L. Stobie, C. Prussin, D. L. Sacks, N. Glaichenhaus, A. Iwasaki, D. J. Fowell, R. M. Locksley, J. T. Chang, C. Y. Wu y R. A. Seder (2000). "Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells." *J Immunol* 165(2): 915-924.

Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." *Clin Microbiol Rev* 14(2): 229-243.

Handman, E., L. L. Button y R. W. McMaster (1990). "*Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice." *Exp Parasitol* 70(4): 427-435.

Handman, E., A. H. Osborn, F. Symons, R. van Driel y R. Cappai (1995). "The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle." *Mol Biochem Parasitol* 74(2): 189-200.

Handman, E., F. M. Symons, T. M. Baldwin, J. M. Curtis y J. P. Scheerlinck (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response." *Infect Immun* 63(11): 4261-4267.

Heeg, K., A. Dalpke, M. Peter y S. Zimmermann (2008). "Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides." *Int J Med Microbiol* 298(1-2): 33-38.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda y S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-745.

Hirohashi, N. y D. C. Morrison (1996). "Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro." *Infect Immun* 64(3): 1011-1015.

Hommel, M. (1999). "Visceral leishmaniasis: biology of the parasite." *J Infect* 39(2): 101-111.

Hori, S., A. Collette, J. Demengeot y J. Stewart (2002). "A new statistical method for quantitative analyses: application to the precise quantification of T cell receptor repertoires." *J Immunol Methods* 268(2): 159-170.

Huynh, C. y N. W. Andrews (2008). "Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*." *Cell Microbiol* 10(2): 293-300.

Iborra, S., D. R. Abanades, N. Parody, J. Carrion, R. M. Risueno, M. A. Pineda, P. Bonay, C. Alonso y M. Soto (2007). "The immunodominant T helper 2 (Th2) response elicited in BALB/c mice by the *Leishmania* LiP2a and LiP2b acidic ribosomal proteins cannot be reverted by strong Th1 inducers." *Clin Exp Immunol* 150(2): 375-385.

Iborra, S., J. Carrion, C. Anderson, C. Alonso, D. Sacks y M. Soto (2005). "Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice." *Infect Immun* 73(9): 5842-5852.

Iborra, S., N. Parody, D. R. Abanades, P. Bonay, D. Prates, F. O. Novais, M. Barral-Netto, C. Alonso y M. Soto (2008). "Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice." *Microbes Infect* 10(10-11): 1133-1141.

Iborra, S., M. Soto, J. Carrion, C. Alonso y J. M. Requena (2004). "Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis." *Vaccine* 22(29-30): 3865-3876.

Iborra, S., M. Soto, J. Carrion, A. Nieto, E. Fernandez, C. Alonso y J. M. Requena (2003). "The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice." *Infect Immun* 71(11): 6562-6572.

Ilg, T., D. Harbecke y P. Overath (1993). "The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum." *FEBS Lett* 327(1): 103-107.

Iniesta, V., L. C. Gomez-Nieto, I. Molano, A. Mohedano, J. Carcelen, C. Miron, C. Alonso y I. Corraliza (2002). "Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites." *Parasite Immunol* 24(3): 113-118.

Jordan, K. A. y C. A. Hunter (2010). "Regulation of CD8(+) T cell responses to infection with parasitic protozoa." *Exp Parasitol*.

Julia, V., M. Rassoulzadegan y N. Glaichenhaus (1996). "Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen." *Science* 274(5286): 421-423.

Kamhawi, S. (2000). "The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections." *Microbes Infect* 2(14): 1765-1773.

Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* 3(12): 984-993.

Kedzierski, L. (2010). "Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today?" *J Glob Infect Dis* 2(2): 177-185.

Kedzierski, L., Y. Zhu y E. Handman (2006). "*Leishmania* vaccines: progress and problems." *Parasitology* 133 Suppl: S87-112.

Kemp, M. (1997). "Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections." *APMIS Suppl* 68: 1-33.

Kharazmi, A., H. R. Rezai, M. Fani y N. C. Behforouz (1982). "Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of kala-azar patients." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76(6): 793-796.

Kitaura, K., K. Kanayama, Y. Fujii, N. Shiobara, K. Tanaka, I. Kurane, S. Suzuki, T. Itoh y R. Suzuki (2009). "T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment." *Exp Anim* 58(2): 159-168.

Klinman, D. M., D. Currie, I. Gursel y D. Verthelyi (2004). "Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants." *Immunol Rev* 199: 201-216.

Klinman, D. M., S. Klaschik, T. Sato y D. Tross (2009). "CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases." *Adv Drug Deliv Rev* 61(3): 248-255.

Krishnamachari, Y. y A. K. Salem (2009). "Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides." *Adv Drug Deliv Rev* 61(3): 205-217.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Lang, T., R. Hellio, P. M. Kaye y J. C. Antoine (1994). "*Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation." *J Cell Sci* 107 (Pt 8): 2137-2150.

LaRocque, R. y M. A. Robinson (1996). "Diversity in the human T cell receptor beta chain." *Hum Immunol* 48(1-2): 3-11.

Lartey, M., L. Adusei, L. Hanson-Nortey y J. Addy (2006). "Coinfection of Cutaneous Leishmaniasis and HIV Infection." *Ghana Med J* 40(3): 110-112.

Laskay, T., A. Diefenbach, M. Rollinghoff y W. Solbach (1995). "Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection." *Eur J Immunol* 25(8): 2220-2227.

Laskay, T., G. van Zandbergen y W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" *Trends Microbiol* 11(5): 210-214.

Laufs, H., K. Muller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach y T. Laskay (2002). "Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors." *Infect Immun* 70(2): 826-835.

Launois, P., I. Maillard, S. Pingel, K. G. Swihart, I. Xenarios, H. Acha-Orbea, H. Diggelmann, R. M. Locksley, H. R. MacDonald y J. A. Louis (1997). "IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice." *Immunity* 6(5): 541-549.

Launois, P., T. Ohteki, K. Swihart, H. R. MacDonald y J. A. Louis (1995). "In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1." *Eur J Immunol* 25(12): 3298-3307.

Launois, P., F. Tacchini-Cottier y M. P. Kieny (2008). "Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine." *Expert Rev Vaccines* 7(8): 1277-1287.

Le, R. Q., J. J. Melenhorst, M. Battiwalla, B. Hill, S. Memon, B. N. Savani, A. Shenoy, N. F. Hensel, E. K. Koklanaris, K. Keyvanfar, F. T. Hakim, D. C. Douek y A. J. Barrett (2011). "Evolution of the donor T cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation." *Blood*.

Lieber, M. R. (1991). "Site-specific recombination in the immune system." *FASEB J* 5(14): 2934-2944.

Liese, J., U. Schleicher y C. Bogdan (2008). "The innate immune response against *Leishmania* parasites." *Immunobiology* 213(3-4): 377-387.

Lin, M. Y. y R. M. Welsh (1998). "Stability and diversity of T cell receptor repertoire usage during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice." *J Exp Med* 188(11): 1993-2005.

Liu, Y., X. Luo, C. Yang, S. Yu y H. Xu (2011). "Three CpG oligodeoxynucleotide classes differentially enhance antigen-specific humoral and cellular immune responses in mice." *Vaccine*.

Lonardonì, M. V., M. Russo y S. Jancar (2000). "Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection." *Infect Immun* 68(11): 6355-6361.

MacMicking, J., Q. W. Xie y C. Nathan (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.

Malherbe, L., C. Filippi, V. Julia, G. Foucras, M. Moro, H. Appel, K. Wucherpfennig, J. C. Guery y N. Glaichenhaus (2000). "Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*." *Immunity* 13(6): 771-782.

Matthews, D. J., C. L. Emson, G. J. McKenzie, H. E. Jolin, J. M. Blackwell y A. N. McKenzie (2000). "IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection." *J Immunol* 164(3): 1458-1462.

Mazumder, S., M. Maji, A. Das y N. Ali (2011). "Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice." *PLoS One* 6(2): e14644.

McMahon-Pratt, D. y J. Alexander (2004). "Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?" *Immunol Rev* 201: 206-224.

McShane, H. (2002). "Prime-boost immunization strategies for infectious diseases." *Curr Opin Mol Ther* 4(1): 23-27.

Mendez, S., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, D. Sacks y Y. Belkaid (2004). "Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity." *J Exp Med* 200(2): 201-210.

Mendez, S., K. Tabbara, Y. Belkaid, S. Bertholet, D. Verthelyi, D. Klinman, R. A. Seder y D. L. Sacks (2003). "Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability." *Infect Immun* 71(9): 5121-5129.

Miqueu, P., M. Guillet, N. Degauque, J. C. Dore, J. P. Soulillou y S. Brouard (2007). "Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases." *Mol Immunol* 44(6): 1057-1064.

Modabber, F. (2010). "Leishmaniasis vaccines: past, present and future." *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S58-61.

Molano, I., M. G. Alonso, C. Miron, E. Redondo, J. M. Requena, M. Soto, C. G. Nieto y C. Alonso (2003). "A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*." *Vet Immunol Immunopathol* 92(1-2): 1-13.

Moody, S. F., E. Handman, M. J. McConville y A. Bacic (1993). "The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan." *J Biol Chem* 268(25): 18457-18466.

Moreno, J. y J. Alvar (2002). "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model." *Trends Parasitol* 18(9): 399-405.

Mosser, D. M. y A. Brittingham (1997). "*Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation." *Parasitology* 115 Suppl: S9-23.

Mougneau, E., F. Bihl y N. Glaichenhaus (2011). "Cell biology and immunology of *Leishmania*." *Immunol Rev* 240(1): 286-296.

Muleme, H. M., R. M. Reguera, A. Berard, R. Azinwi, P. Jia, I. B. Okwor, S. Beverley y J. E. Uzonna (2009). "Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis." *J Immunol* 183(12): 8068-8076.

Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies y N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." *Lancet* 366(9496): 1561-1577.

Murray, H. W. y C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*." *J Exp Med* 189(4): 741-746.

Nagill, R. y S. Kaur (2011). "Vaccine candidates for leishmaniasis: A review." *Int Immunopharmacol*.

Nishikomori, R., S. Gurunathan, K. Nishikomori y W. Strober (2001). "BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor beta 2 gene exhibit a nonhealing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling." *J Immunol* 166(11): 6776-6783.

Noazin, S., F. Modabber, A. Khamesipour, P. G. Smith, L. H. Moulton, K. Nasser, I. Sharifi, E. A. Khalil, I. D. Bernal, C. M. Antunes, M. P. Kienny y M. Tanner (2008). "First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials." *Vaccine* 26(52): 6759-6767.

Noben-Trauth, N., R. Lira, H. Nagase, W. E. Paul y D. L. Sacks (2003). "The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*." *J Immunol* 170(10): 5152-5158.

Nogueira, M. F., H. Goto, M. N. Sotto y L. C. Cuce (2008). "Cytokine profile in Montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50(6): 333-337.

Nylen, S. y H. Akuffo (2009). "Tracing immunity to human leishmaniasis." *Future Microbiol* 4(2): 241-254.

Okwor, I., D. Liu, S. M. Beverley y J. E. Uzonna (2009). "Inoculation of killed *Leishmania major* into immune mice rapidly disrupts immunity to a secondary challenge via IL-10-mediated process." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13951-13956.

Okwor, I., D. Liu y J. Uzonna (2009). "Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis." *Vaccine* 27(19): 2554-2562.

Okwor, I. y J. Uzonna (2008). "Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies." *Immunol Res* 41(2): 123-136.

Padigel, U. M. y J. P. Farrell (2005). "Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells." *J Immunol* 174(10): 6340-6345.

Pallas, D. C., C. Schley, M. Mahoney, E. Harlow, B. S. Schaffhausen y T. M. Roberts (1986). "Polyomavirus small t antigen: overproduction in bacteria, purification, and utilization for monoclonal and polyclonal antibody production." *J Virol* 60(3): 1075-1084.

Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller y P. Kourilsky (1993). "The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9): 4319-4323.

Pannetier, C., J. Even y P. Kourilsky (1995). "T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples." *Immunol Today* 16(4): 176-181.

Parody, N. (2004). Capacidad inmunopotenciadora e inmunomoduladora de adyuvantes de diferente naturaleza sobre la proteína Q de *L. infantum*. Estudios de protección en ratones Balb/c frente a la infección con *L. infantum*. Tesis Doctoral - Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

Parody, N., M. Soto, J. M. Requena y C. Alonso (2004). "Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects Balb/c mice from infection." *Parasite Immunol* 26(6-7): 283-293.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.

Puentes, S. M., R. P. Da Silva, D. L. Sacks, C. H. Hammer y K. A. Joiner (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9." *J Immunol* 145(12): 4311-4316.

Rachamim, N. y C. L. Jaffe (1993). "Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis." *J Immunol* 150(6): 2322-2331.

Rafati, S., A. A. Baba, M. Bakhshayesh y M. Vafa (2000). "Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase." *Clin Exp Immunol* 120(1): 134-138.

Rafati, S., A. Kariminia, S. Seyde-Eslami, M. Narimani, T. Taheri y M. Lebbatard (2002). "Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against *Leishmania major* in BALB/c mice: the partial protection relies on interferon gamma producing CD8(+) T lymphocyte activation." *Vaccine* 20(19-20): 2439-2447.

Ramirez, L., S. Iborra, J. Cortes, P. Bonay, C. Alonso, M. Barral-Netto y M. Soto (2010). "BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge." *J Biomed Biotechnol* 2010: 181690.

Reed, S. G., R. N. Coler y A. Campos-Neto (2003). "Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL." *Expert Rev Vaccines* 2(2): 239-252.

Reiner, S. L., Z. E. Wang, F. Hatam, P. Scott y R. M. Locksley (1993). "TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis." *Science* 259(5100): 1457-1460.

Restifo, N. P., H. Ying, L. Hwang y W. W. Leitner (2000). "The promise of nucleic acid vaccines." *Gene Ther* 7(2): 89-92.

Rhee, E. G., S. Mendez, J. A. Shah, C. Y. Wu, J. R. Kirman, T. N. Turon, D. F. Davey, H. Davis, D. M. Klinman, R. N. Coler, D. L. Sacks y R. A. Seder (2002). "Vaccination with heat-killed *leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *leishmania major* infection." *J Exp Med* 195(12): 1565-1573.

Rittig, M. G. y C. Bogdan (2000). "*Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views." *Parasitol Today* 16(7): 292-297.

Rivier, D., P. Bovay, R. Shah, S. Didisheim y J. Mauel (1999). "Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection." *Parasite Immunol* 21(9): 461-473.

Rogers, K. A., G. K. DeKrey, M. L. Mbow, R. D. Gillespie, C. I. Brodskyn y R. G. Titus (2002). "Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*." *FEMS Microbiol Lett* 209(1): 1-7.

Ronet, C., Y. Hauyon-La Torre, M. Revaz-Breton, B. Mastelic, F. Tacchini-Cottier, J. Louis y P. Launois (2010). "Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production." *J Immunol* 184(2): 886-894.

Rougeron, V., T. De Meeus, S. Kako Ouraga, M. Hide y A. L. Banuls (2010). "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask) in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses." *PLoS Pathog* 6(8).

Russo, D. M., J. M. Burns, Jr., E. M. Carvalho, R. J. Armitage, K. H. Grabstein, L. L. Button, W. R. McMaster y S. G. Reed (1991). "Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*." *J Immunol* 147(10): 3575-3580.

Sacks, D. y C. Anderson (2004). "Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice." *Immunol Rev* 201: 225-238.

Sacks, D. y N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." *Nat Rev Immunol* 2(11): 845-858.

Sacks, D. y A. Sher (2002). "Evasion of innate immunity by parasitic protozoa." *Nat Immunol* 3(11): 1041-1047.

Sakthianandeswaren, A., S. J. Foote y E. Handman (2009). "The role of host genetics in leishmaniasis." *Trends Parasitol* 25(8): 383-391.

Sanchez, V. R., M. N. Pitkowski, A. V. Fernandez Cuppari, F. M. Rodriguez, I. M. Fenoy, F. M. Frank, A. Goldman, R. S. Corral y V. Martin (2011). "Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection." *Exp Parasitol*.

Schijns, V. E. (2003). "Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants." *Vaccine* 21(9-10): 829-831.

Selvapandiyan, A., R. Dey, S. Nysten, R. Duncan, D. Sacks y H. L. Nakhasi (2009). "Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis." *J Immunol* 183(3): 1813-1820.

Sharma, U. y S. Singh (2009). "Immunobiology of leishmaniasis." *Indian J Exp Biol* 47(6): 412-423.

Shi, P. Y., N. Maizels y A. M. Weiner (1997). "Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies." *Biotechniques* 23(6): 1036-1038.

Sjolander, A., T. M. Baldwin, J. M. Curtis, K. L. Bengtsson y E. Handman (1998). "Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection." *Vaccine* 16(20): 2077-2084.

Skeiky, Y. A., R. N. Coler, M. Brannon, E. Stromberg, K. Greeson, R. T. Crane, J. R. Webb, A. Campos-Neto y S. G. Reed (2002). "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant." *Vaccine* 20(27-28): 3292-3303.

Solbach, W. y T. Laskay (2000). "The host response to *Leishmania* infection." *Adv Immunol* 74: 275-317.

Song, X., F. Liang, N. Liu, Y. Luo, H. Xue, F. Yuan, L. Tan, Y. Sun, C. Xi y Y. Xi (2009). "Construction and characterization of a novel DNA vaccine that is potent antigen-specific tolerizing therapy for experimental arthritis by increasing CD4+CD25+Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines." *Vaccine* 27(5): 690-700.

Soong, L., S. M. Duboise, P. Kima y D. McMahon-Pratt (1995). "*Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun* 63(9): 3559-3566.

Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada y C. Alonso (1996). "Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins." *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4): 387-391.

Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada y C. Alonso (1998). "Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis." *J Clin Microbiol* 36(1): 58-63.

Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, S. O. Angel, L. C. Gomez, F. Guzman, M. E. Patarroyo y C. Alonso (1995 a). "During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins." *Clin Exp Immunol* 100(2): 246-252.

Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, M. Garcia, F. Guzman, M. E. Patarroyo y C. Alonso (1995 c). "Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis." *Immunol Lett* 48(3): 209-214.

Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, F. Guzman, M. E. Patarroyo y C. Alonso (1995 b). "Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis." *Immunol Lett* 48(1): 23-28.

Steinman, R. M. (2007). "Dendritic cells: understanding immunogenicity." *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S53-60.

Stober, C. B., U. G. Lange, M. T. Roberts, A. Alcami y J. M. Blackwell (2005). "IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection." *J Immunol* 175(4): 2517-2524.

Sundar, S. y M. Rai (2002). "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis." *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5): 951-958.

Tacchini-Cottier, F., C. Zweifel, Y. Belkaid, C. Mukankundiye, M. Vasei, P. Launois, G. Milon y J. A. Louis (2000). "An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*." *J Immunol* 165(5): 2628-2636.

Tapia, E., E. Perez-Jimenez, L. Lopez-Fuertes, R. Gonzalo, M. M. Gherardi y M. Esteban (2003). "The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK." *Microbes Infect* 5(2): 73-84.

Tremblay, M., M. Olivier y R. Bernier (1996). "*Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection." *Parasitol Today* 12(7): 257-261.

Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman y et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." *Science* 259(5102): 1745-1749.

Uzonna, J. E., G. Wei, D. Yurkowski y P. Bretscher (2001). "Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease." *J Immunol* 167(12): 6967-6974.

Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, E. Rowton y J. M. Ribeiro (2001). "The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases." *J Exp Biol* 204(Pt 2): 229-237.

Vega-Lopez, F. (2003). "Diagnosis of cutaneous leishmaniasis." *Curr Opin Infect Dis* 16(2): 97-101.

Velez, I. D., K. Gilchrist, M. P. Arbelaez, C. A. Rojas, J. A. Puerta, C. M. Antunes, F. Zicker y F. Modabber (2005). "Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99(8): 593-598.

von Stebut, E. (2007). "Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy." *Exp Dermatol* 16(4): 340-346.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani y P. L. Felgner (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-1468.

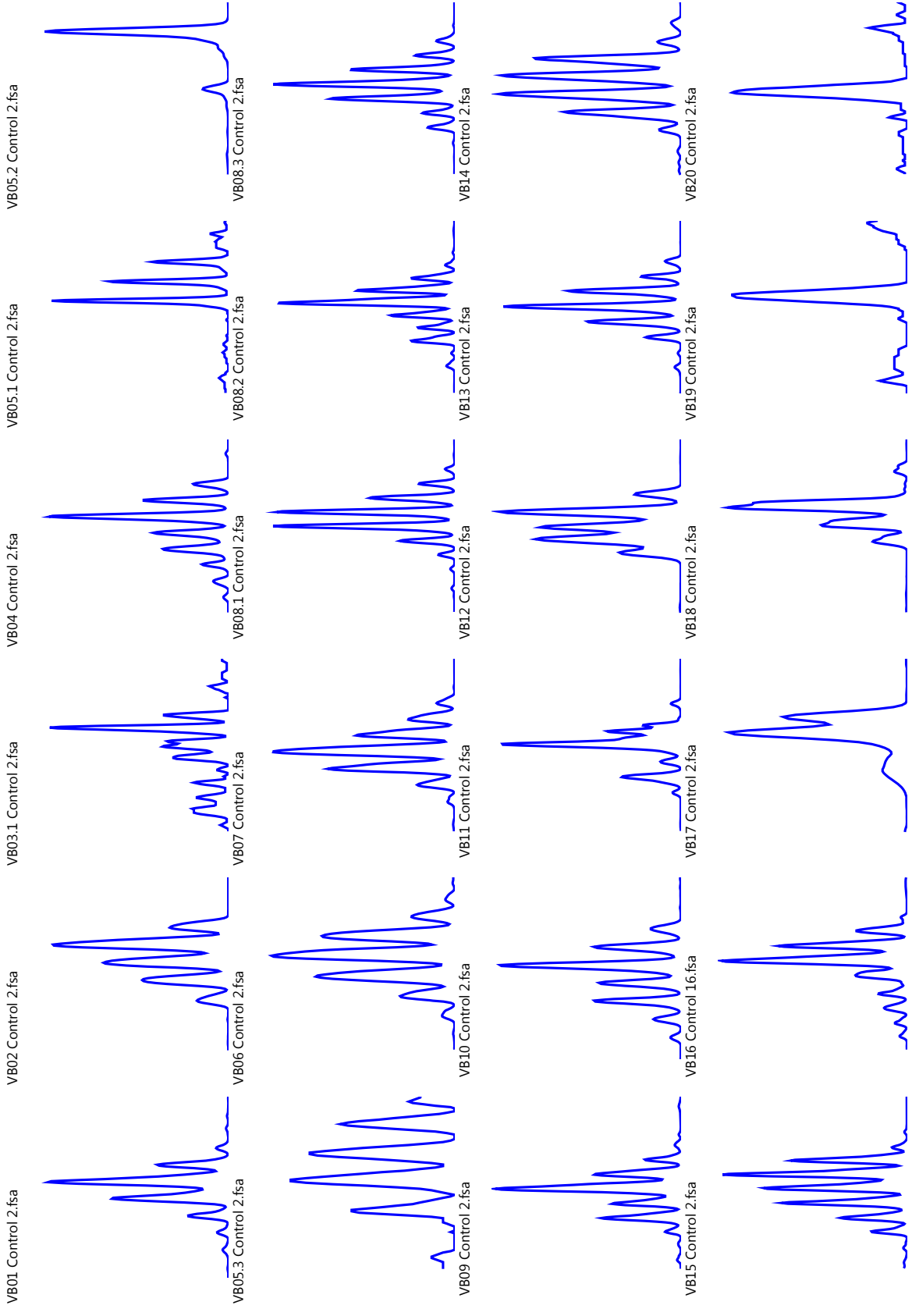
Wu, W., L. Weigand y S. Mendez (2009). "The IL-6-deficient mouse exhibits impaired lymphocytic responses to a vaccine combining live *Leishmania major* and CpG oligodeoxynucleotides." *Can J Microbiol* 55(6): 705-713.

Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano y T. Tokunaga (1992). "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity." *J Immunol* 148(12): 4072-4076.

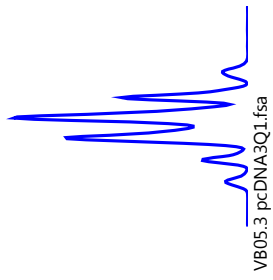
Zaph, C., J. Uzonna, S. M. Beverley y P. Scott (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites." *Nat Med* 10(10): 1104-1110.

ANEXO 1

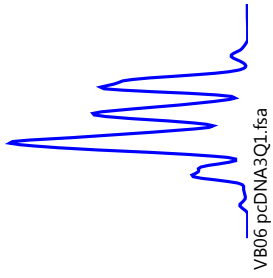
Espectratipos correspondientes a los animales inmunizados de los grupos control, pcDNA3Q y Q.



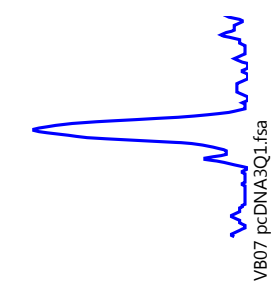
VB01 pcDNA3Q1.fsa



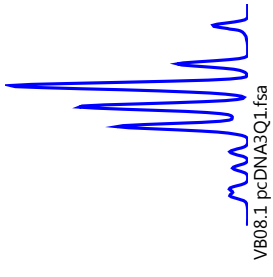
VB02 pcDNA3Q1.fsa



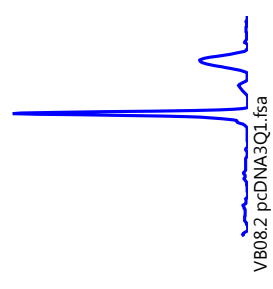
VB03.1 pcDNA3Q1.fsa



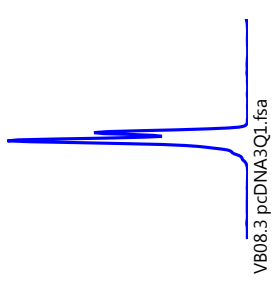
VB04 pcDNA3Q1.fsa



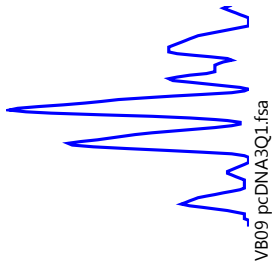
VB05.1 pcDNA3Q1.fsa



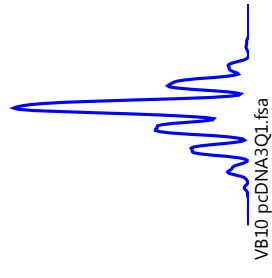
VB05.2 pcDNA3Q1.fsa



VB05.3 pcDNA3Q1.fsa



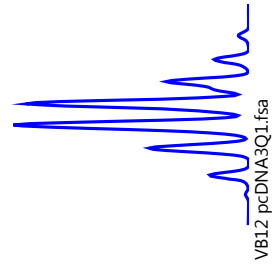
VB06 pcDNA3Q1.fsa



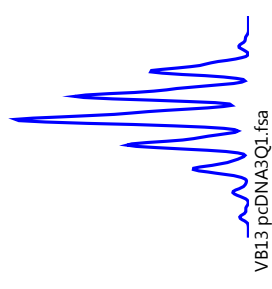
VB07 pcDNA3Q1.fsa



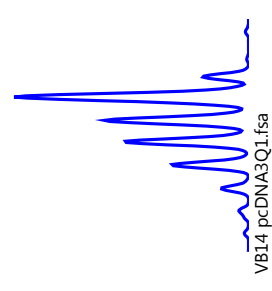
VB08.1 pcDNA3Q1.fsa



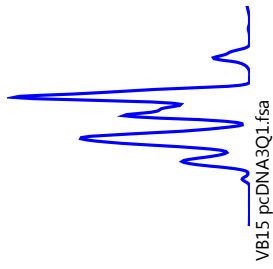
VB08.2 pcDNA3Q1.fsa



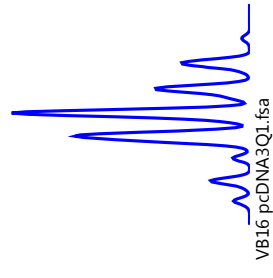
VB08.3 pcDNA3Q1.fsa



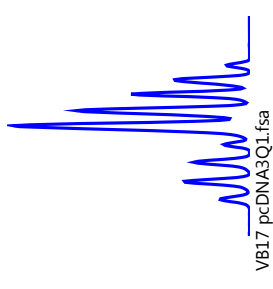
VB09 pcDNA3Q1.fsa



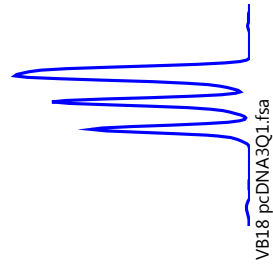
VB10 pcDNA3Q1.fsa



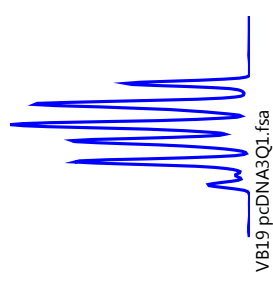
VB11 pcDNA3Q1.fsa



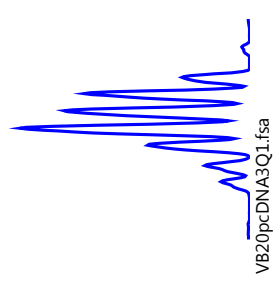
VB12 pcDNA3Q1.fsa



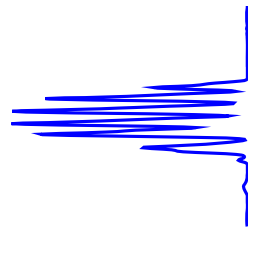
VB13 pcDNA3Q1.fsa



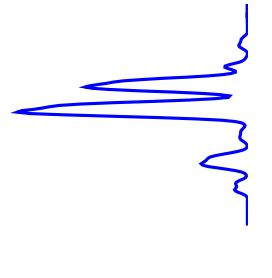
VB14 pcDNA3Q1.fsa



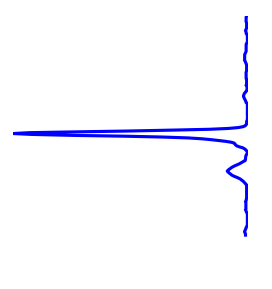
VB15 pcDNA3Q1.fsa



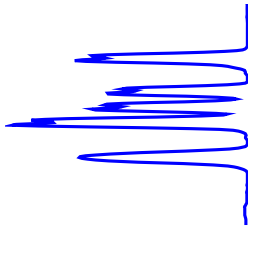
VB16 pcDNA3Q1.fsa



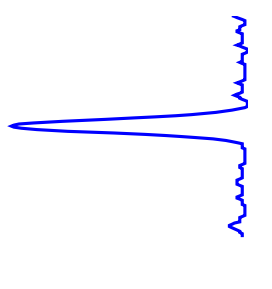
VB17 pcDNA3Q1.fsa



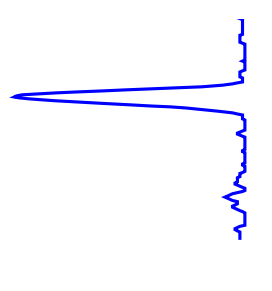
VB18 pcDNA3Q1.fsa



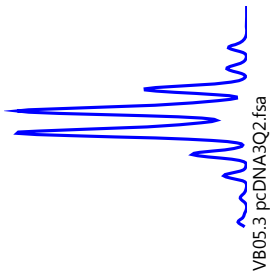
VB19 pcDNA3Q1.fsa



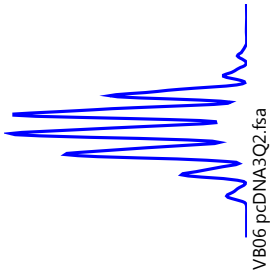
VB20 pcDNA3Q1.fsa



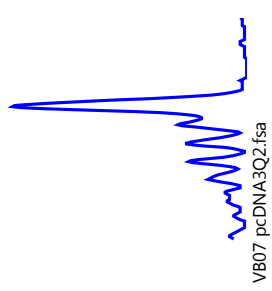
VB01 pcDNA3Q2.fsa



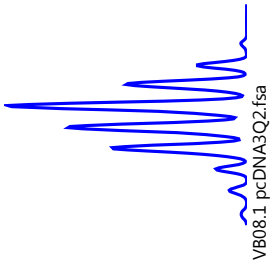
VB02 pcDNA3Q2.fsa



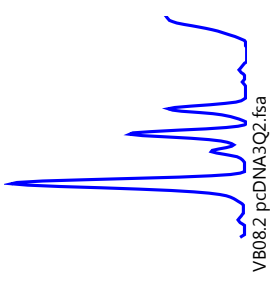
VB03.1 pcDNA3Q2.fsa



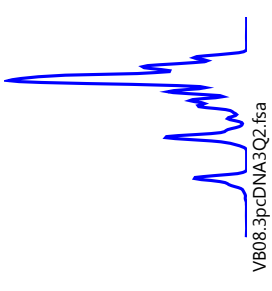
VB04 pcDNA3Q2.fsa



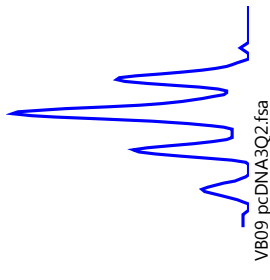
VB05.1 pcDNA3Q2.fsa



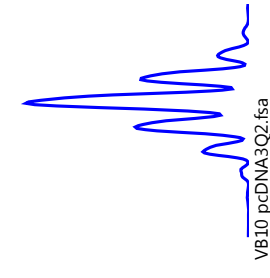
VB05.2 pcDNA3Q2.fsa



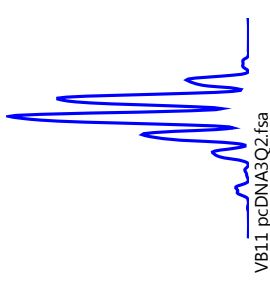
VB05.3 pcDNA3Q2.fsa



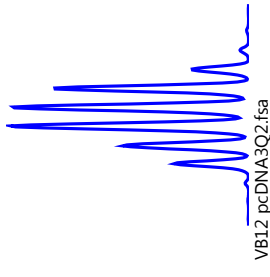
VB06 pcDNA3Q2.fsa



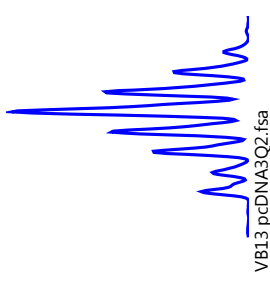
VB07 pcDNA3Q2.fsa



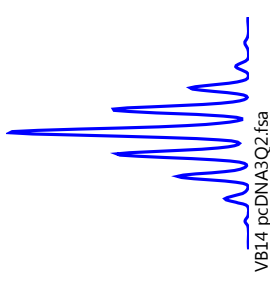
VB08.1 pcDNA3Q2.fsa



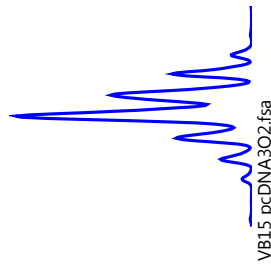
VB08.2 pcDNA3Q2.fsa



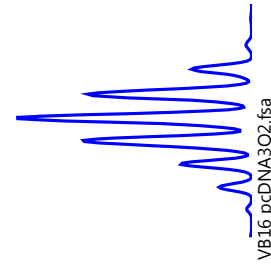
VB08.3 pcDNA3Q2.fsa



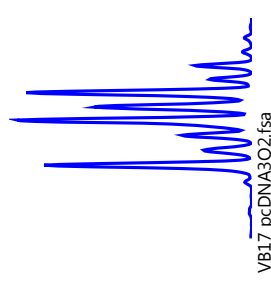
VB09 pcDNA3Q2.fsa



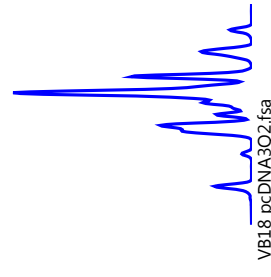
VB10 pcDNA3Q2.fsa



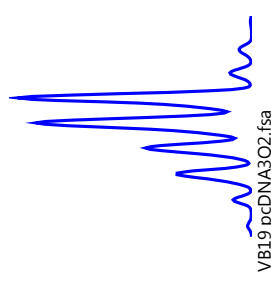
VB11 pcDNA3Q2.fsa



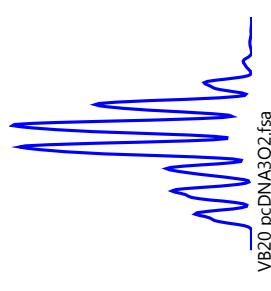
VB12 pcDNA3Q2.fsa



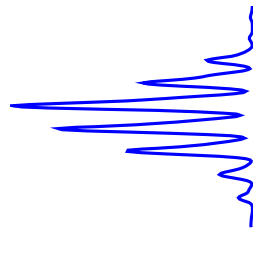
VB13 pcDNA3Q2.fsa



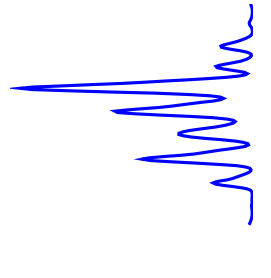
VB14 pcDNA3Q2.fsa



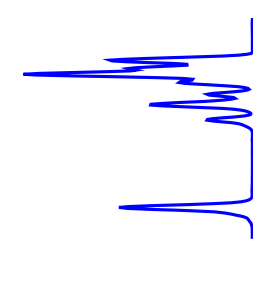
VB15 pcDNA3Q2.fsa



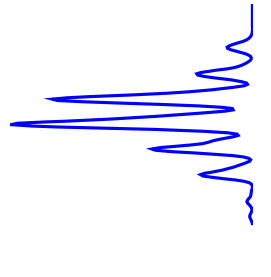
VB16 pcDNA3Q2.fsa



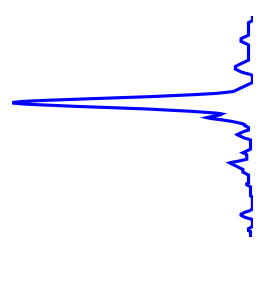
VB17 pcDNA3Q2.fsa



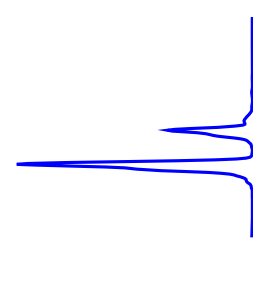
VB18 pcDNA3Q2.fsa



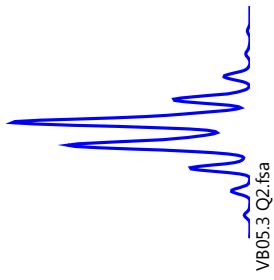
VB19 pcDNA3Q2.fsa



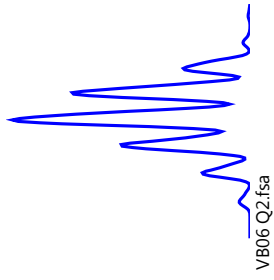
VB20 pcDNA3Q2.fsa



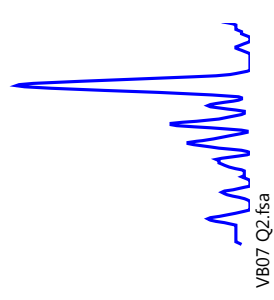
VB01_Q2.fsa



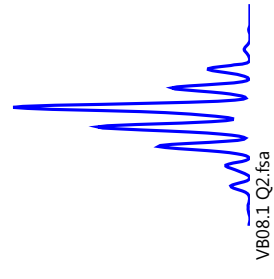
VB02_Q2.fsa



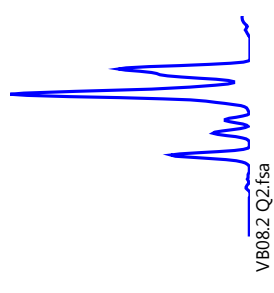
VB03.1_Q2.fsa



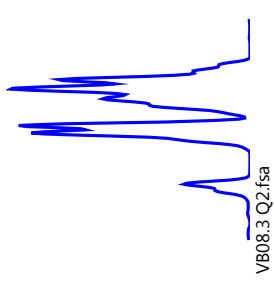
VB04_Q2.fsa



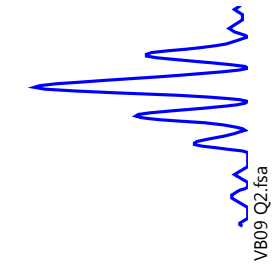
VB05.1_Q2.fsa



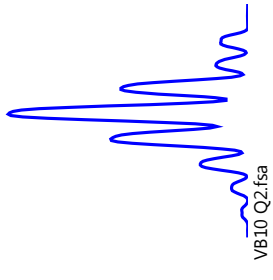
VB05.2_Q2.fsa



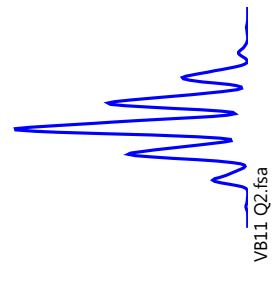
VB05.3_Q2.fsa



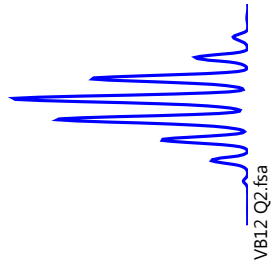
VB06_Q2.fsa



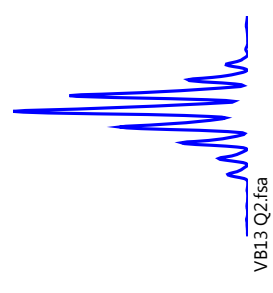
VB07_Q2.fsa



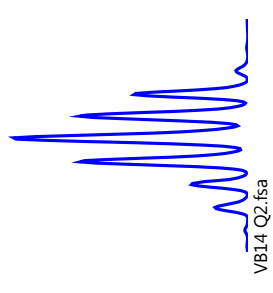
VB08.1_Q2.fsa



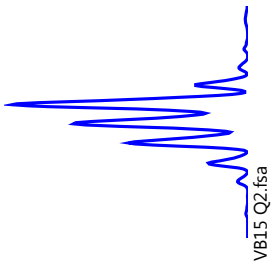
VB08.2_Q2.fsa



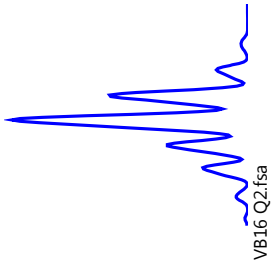
VB08.3_Q2.fsa



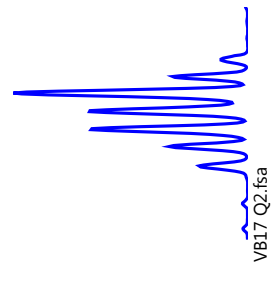
VB09_Q2.fsa



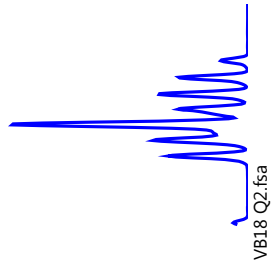
VB10_Q2.fsa



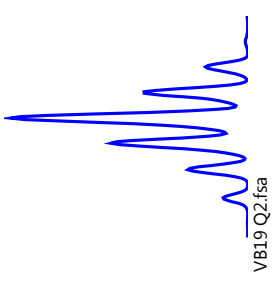
VB11_Q2.fsa



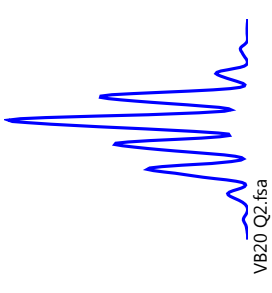
VB12_Q2.fsa



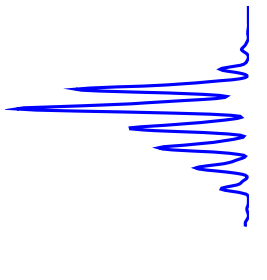
VB13_Q2.fsa



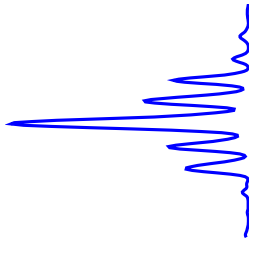
VB14_Q2.fsa



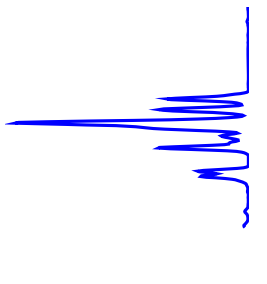
VB15_Q2.fsa



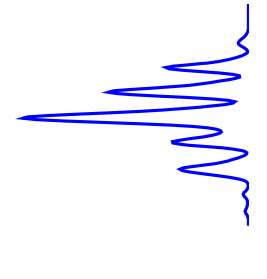
VB16_Q2.fsa



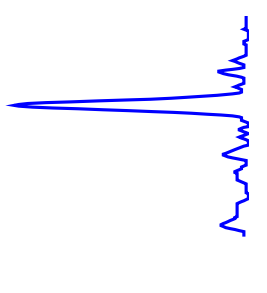
VB17_Q2.fsa



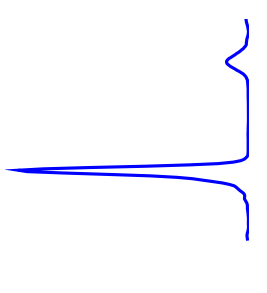
VB18_Q2.fsa



VB19_Q2.fsa



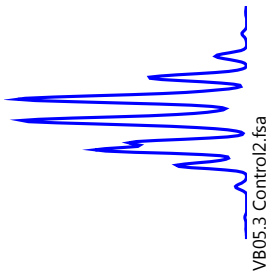
VB20_Q2.fsa



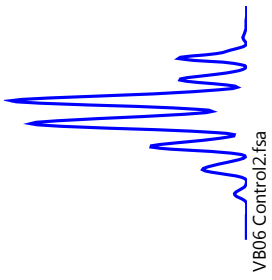
ANEXO 2

Espectratipos correspondientes a los animales infectados de los grupos control, QCpG y pcDNA3Q+QCpG.

VB01 Control2.fsa



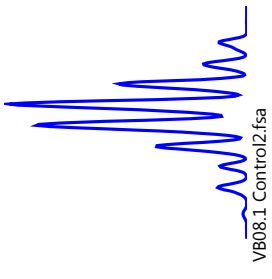
VB02 Control2.fsa



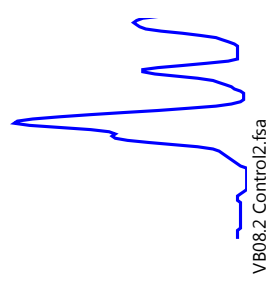
VB03.1 Control2.fsa



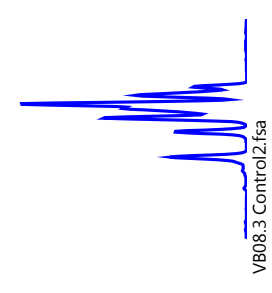
VB04 Control2.fsa



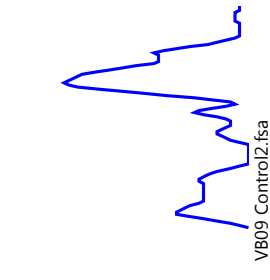
VB05.1 Control2.fsa



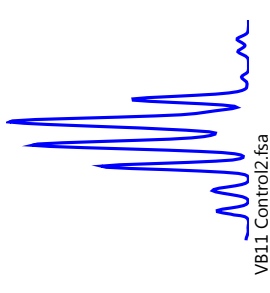
VB05.2 Control2.fsa



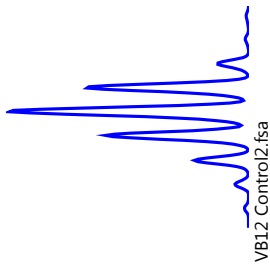
VB05.3 Control2.fsa



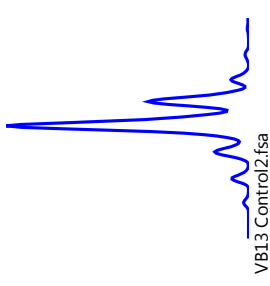
VB07 Control2.fsa



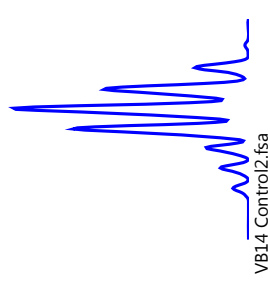
VB08.1 Control2.fsa



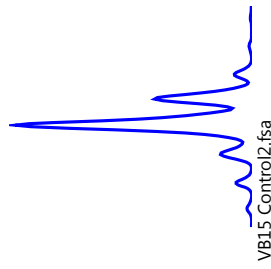
VB08.2 Control2.fsa



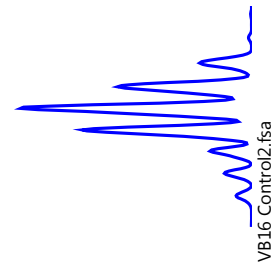
VB08.3 Control2.fsa



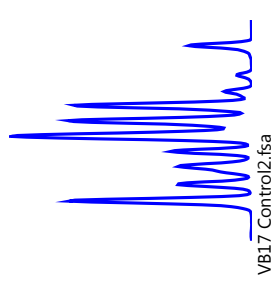
VB09 Control2.fsa



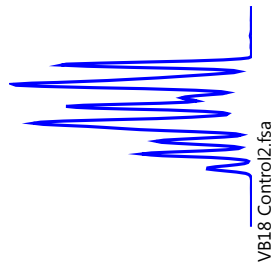
VB10 Control2.fsa



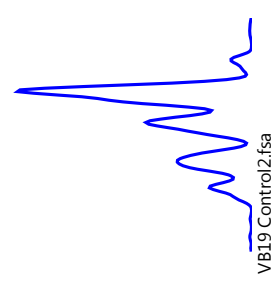
VB11 Control2.fsa



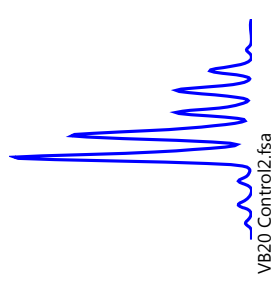
VB12 Control2.fsa



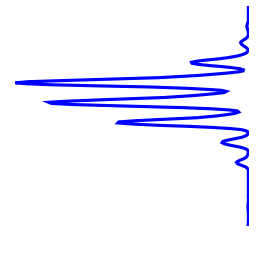
VB13 Control2.fsa



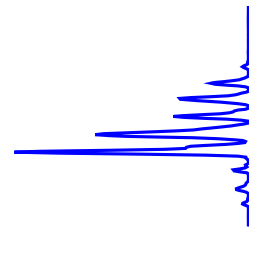
VB14 Control2.fsa



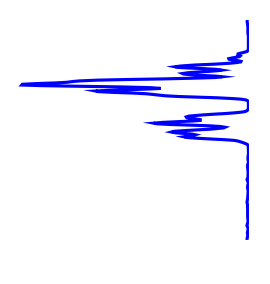
VB15 Control2.fsa



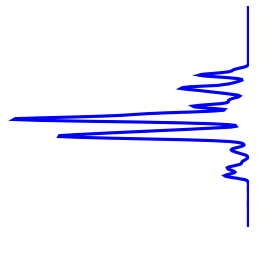
VB16 Control2.fsa



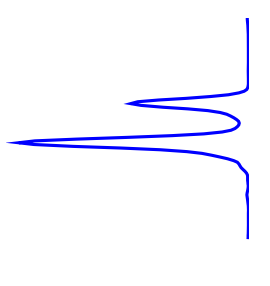
VB17 Control2.fsa



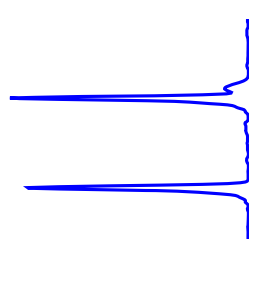
VB18 Control2.fsa



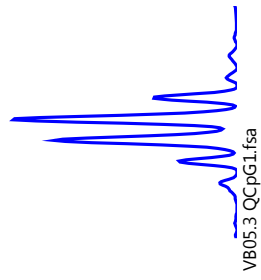
VB19 Control2.fsa



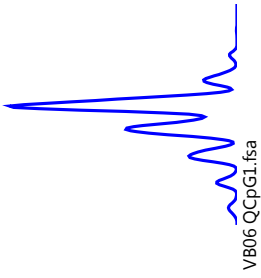
VB20 Control2.fsa



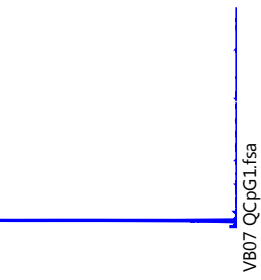
VB01_QCpG1.fsa



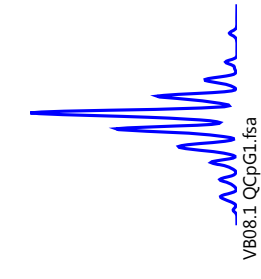
VB02_QCpG1.fsa



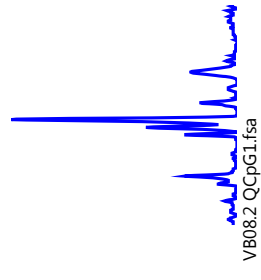
VB03.1_QCpG1.fsa



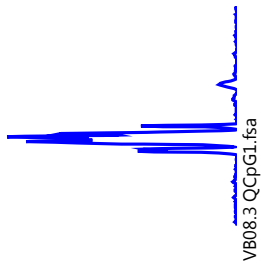
VB04_QCpG1VB01_QCpG1.fsa



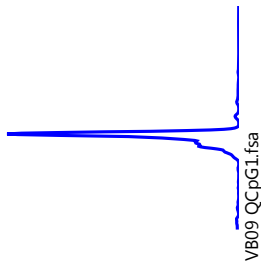
VB05.1_QCpG1.fsa



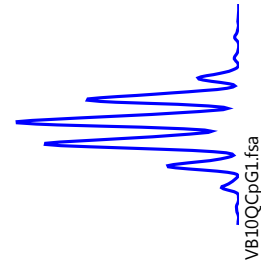
VB05.2_QCpG1.fsa



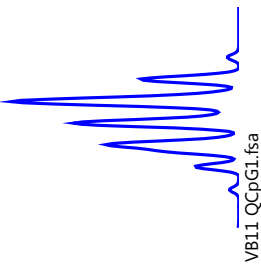
VB05.3_QCpG1.fsa



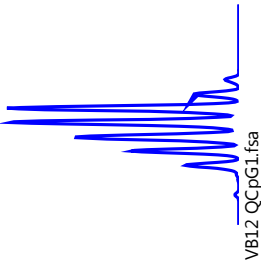
VB06_QCpG1.fsa



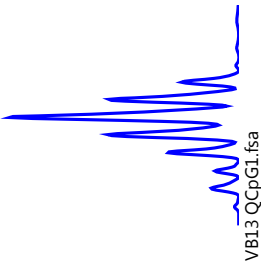
VB07_QCpG1.fsa



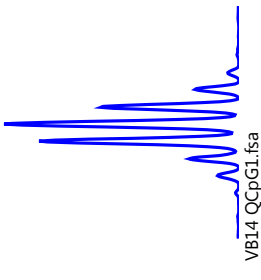
VB08.1_QCpG1.fsa



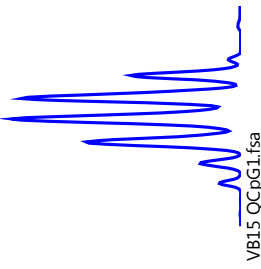
VB08.2_QCpG1.fsa



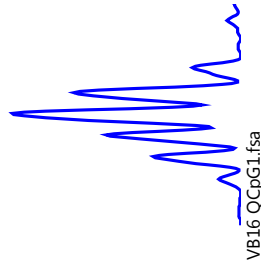
VB08.3_QCpG1.fsa



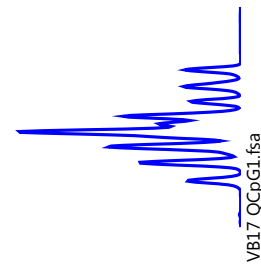
VB09_QCpG1.fsa



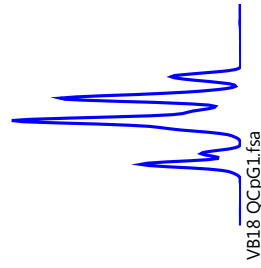
VB10_QCpG1.fsa



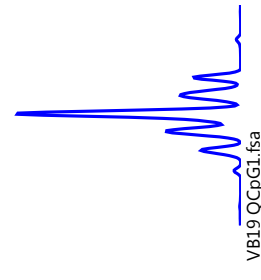
VB11_QCpG1.fsa



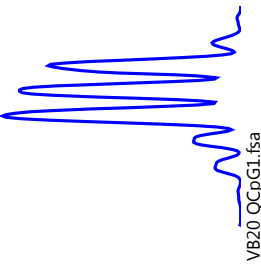
VB12_QCpG1.fsa



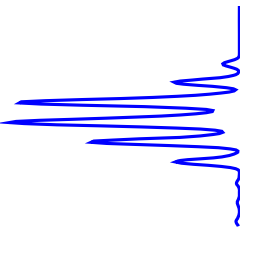
VB13_QCpG1.fsa



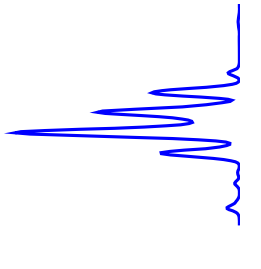
VB14_QCpG1.fsa



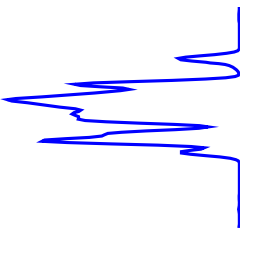
VB15_QCpG1.fsa



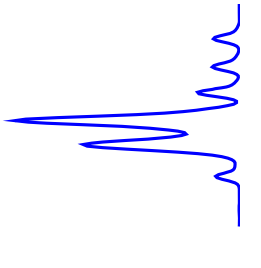
VB16_QCpG1.fsa



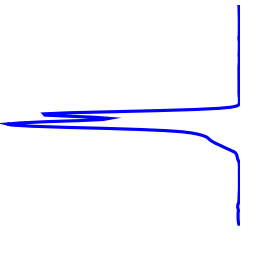
VB17_QCpG1.fsa



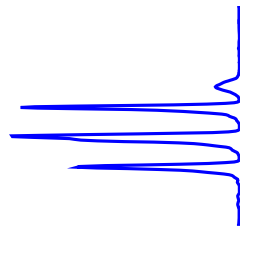
VB18_QCpG1.fsa

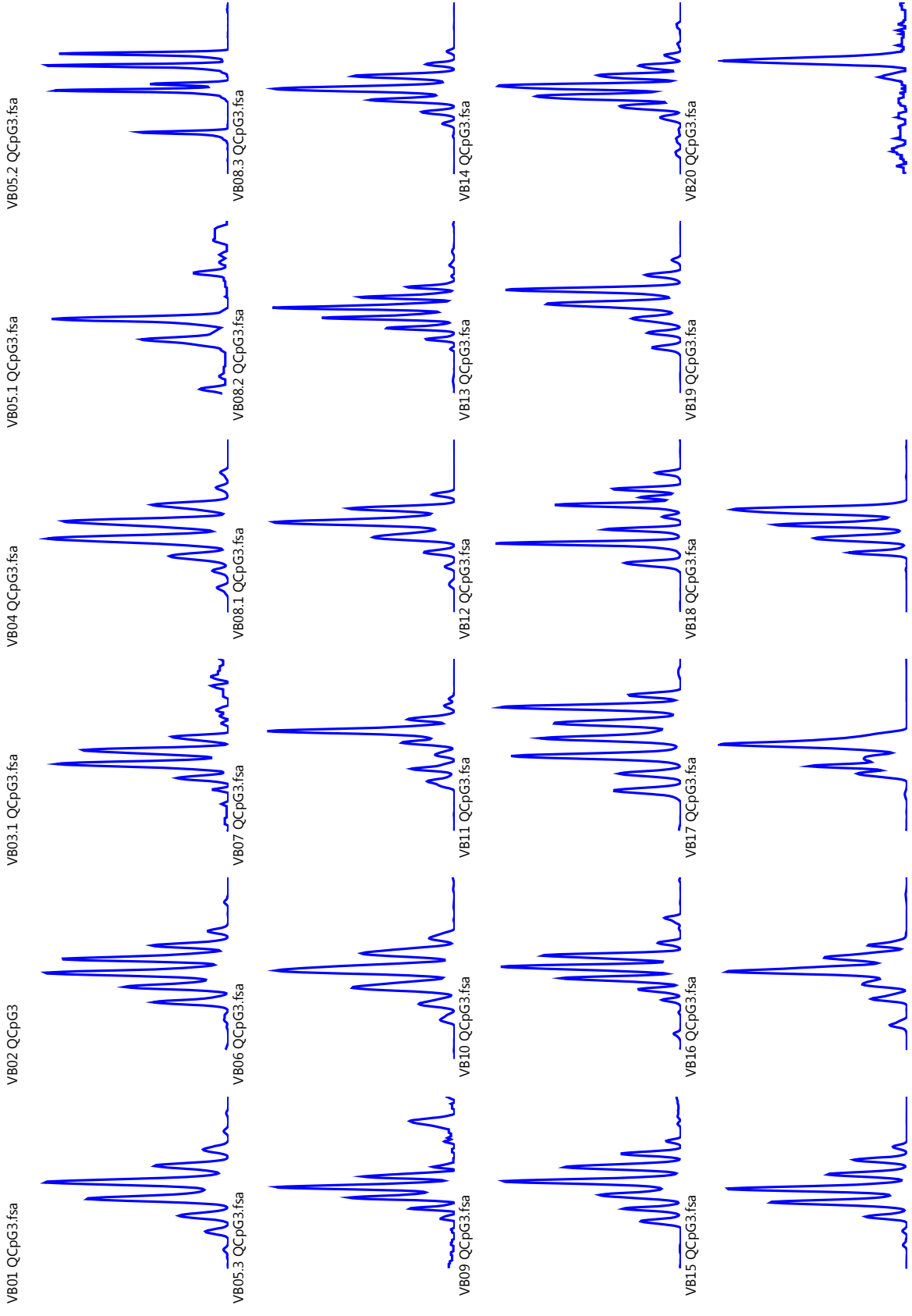


VB19_QCpG1.fsa

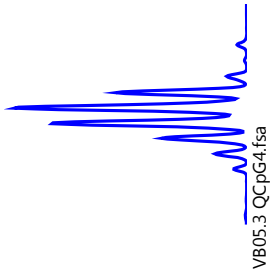


VB20_QCpG1.fsa

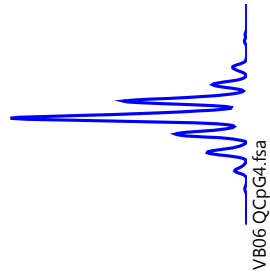




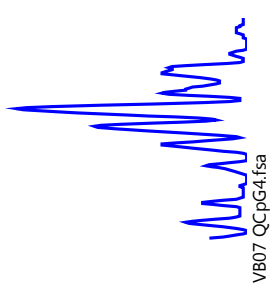
VB01_QCpG4.fsa



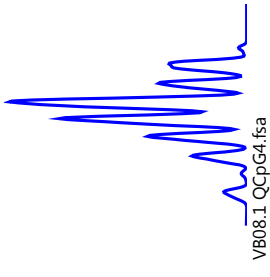
VB02_QCpG4.fsa



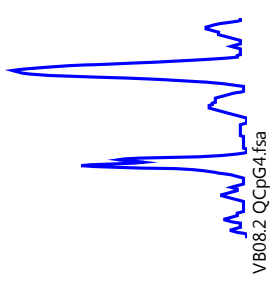
VB03.1_QCpG4.fsa



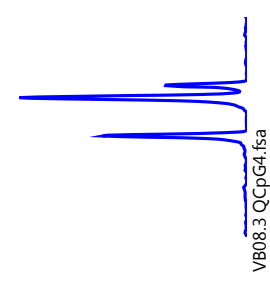
VB04_QCpG4.fsa



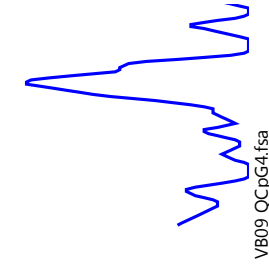
VB05.1_QCpG4.fsa



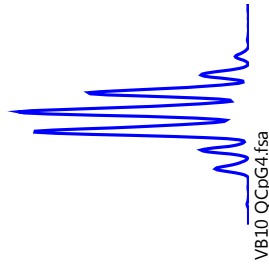
VB05.2_QCpG4.fsa



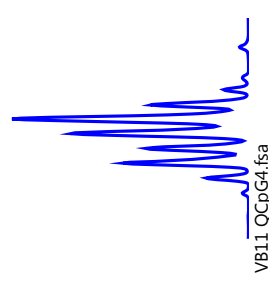
VB05.3_QCpG4.fsa



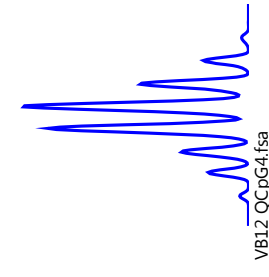
VB06_QCpG4.fsa



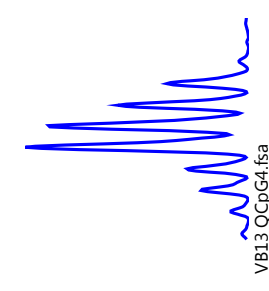
VB07_QCpG4.fsa



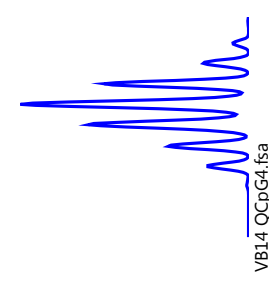
VB08.1_QCpG4.fsa



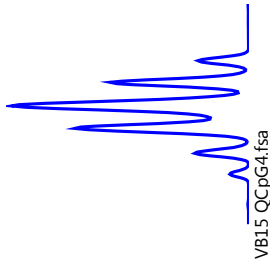
VB08.2_QCpG4.fsa



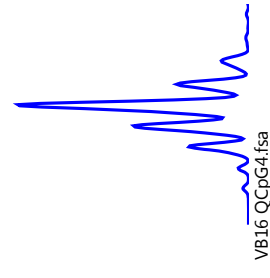
VB08.3_QCpG4.fsa



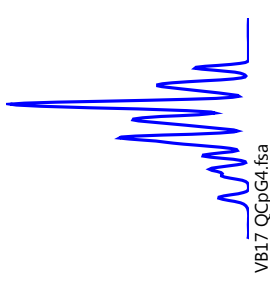
VB09_QCpG4.fsa



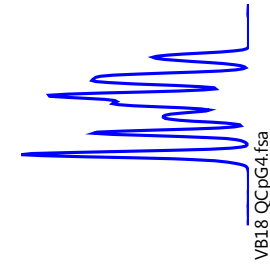
VB10_QCpG4.fsa



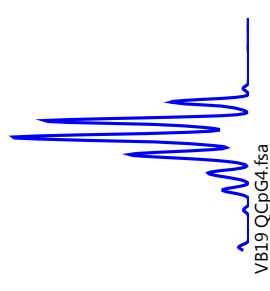
VB11_QCpG4.fsa



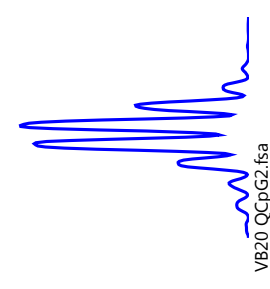
VB12_QCpG4.fsa



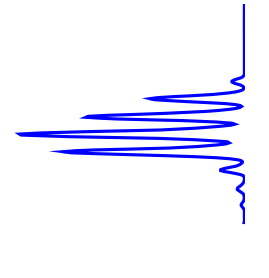
VB13_QCpG4.fsa



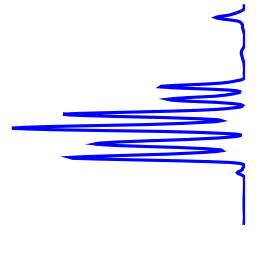
VB14_QCpG4.fsa



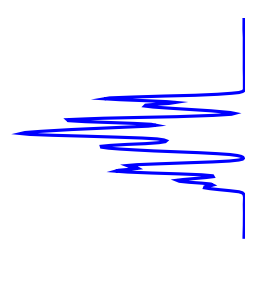
VB15_QCpG4.fsa



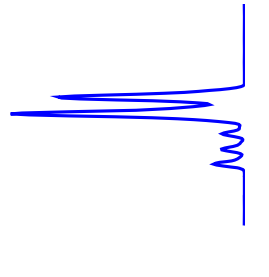
VB16_QCpG4.fsa



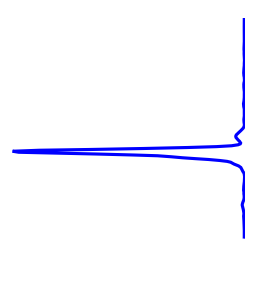
VB17_QCpG4.fsa



VB18_QCpG4.fsa



VB19_QCpG4.fsa



VB20_QCpG2.fsa

