



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

DISEÑO DE UNA NANOVACUNA MULTIEPITÓPICA CONTRA *Leishmania mexicana*

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

ISIS PÉREZ CONCEPCIÓN

Hermosillo, Sonora, México

21 de septiembre de 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 21 de septiembre de 2023.

Asunto: Licencia de uso no exclusiva

UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “**Diseño de una nanovacuna multiepitópica contra *Leishmania mexicana***” (LA OBRA), que realicé como trabajo terminal siendo estudiante de Maestría, como requisito para obtener el Grado de **Maestra en Biociencias** en la Universidad de Sonora (UNISON), y en justa retribución autorizo a la UNISON, para que divulgue total o parcialmente LA OBRA mediante repositorios, bibliotecas, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines educativos, de investigación, de extensión y de difusión de la cultura, las veces que se requieren y en cualquiera otra forma en que a juicio de la UNISON sea necesario utilizarla, sin fines de lucro, en el entendido de que habrá de respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA del que suscribe, frente a terceros.

Esta autorización es gratuita y la otorgo por un tiempo de cinco años, renovable automáticamente por el mismo periodo, reservándome el derecho de manifestar, en un plazo de cuando menos treinta días naturales previos a su vencimiento, su revocación por escrito dirigido a la Rectoría de la Universidad de Sonora.

Así mismo, esta autorización no es exclusiva y no implica la cesión de mis derechos patrimoniales.

A T E N T A M E N T E

Nombre completo y firma: Isis Pérez Concepción



Departamento Académico: Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

Dirección: Luis Donald Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma. Col Centro, C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

Correo electrónico y teléfono: posgrado.biociencias@unison.mx Tel. (662) 2592169.

DISEÑO DE UNA NANOVAQUINA MULTIEPITÓPICA CONTRA

Leishmania mexicana

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

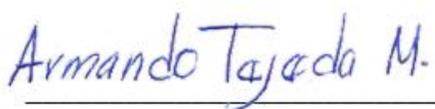
ISIS PÉREZ CONCEPCIÓN

Hermosillo, Sonora, México.

21 de septiembre de 2023

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Diseño de una nanovacuna multi-epitópica contra *Leishmania mexicana* presentada por Isis Pérez Concepción, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias.



Director

Dr. Armando Tejada Mansir



Co-Director

Dr. Roberto Guzmán Zamudio



Secretaria

Dra. Nohemí Gámez Meza



Sinodal interna

Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Tejeda por haberme aceptado bajo su asesoría, por el apoyo brindado durante estos dos años, por sus sugerencias y observaciones en la realización de este proyecto.

A mi co-director Dr. Roberto Guzmán y asesoras Dra. Nohemí Gámez y Dra. Corina Hayano por dedicar su tiempo a la revisión del trabajo y por sus valiosas aportaciones durante los Seminarios de tesis.

Al personal del Área de Computo de Alto Rendimiento de la Universidad de Sonora (ACARUS), por los servicios y el apoyo brindado para los cálculos computacionales.

Al Ing. Jesús Bouza por sus enseñanzas, tiempo y dedicación en la programación en Python; al MsC. Iván Corona por sus aportaciones y valiosos consejos para la optimización de la vacuna.

A mis compañeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Especialmente a la Dra. Elisa Valenzuela, gracias por adoptarme.

A mi familia por su apoyo y comprensión incondicionales; a mis amigos de Cuba, por estar a pesar de la distancia.

A mi familia mexicana: Kat, Julián, Iván, Horacio y Ari.

RESUMEN

Leishmania mexicana es uno de los principales agentes causantes de leishmaniasis cutánea en América, región en la que se reportaron 221,790 casos nuevos de la enfermedad en 2021. La resistencia del patógeno a los fármacos y la carencia de vacunas para humanos, estimulan la búsqueda de alternativas para controlar la enfermedad. El objetivo de este estudio fue diseñar una nanovacuna multi-epitópica contra *L. mexicana* utilizando herramientas inmunoinformáticas. Se analizó *in silico* el proteoma del parásito, determinándose 55 probables antígenos estables y no homólogos con el proteoma humano. Del conjunto de antígenos vacunales, se predijeron epítomos de células B y T, de donde se seleccionaron 12 epítomos inmunogénicos y se combinaron en cuatro construcciones de vacuna. La secuencia de vacuna más estable según los cálculos de ProtParam, denominada CVLm, constó de 58.26 % de enrollamiento aleatorio, 14.78 % de hélice alfa, 18.26 % de hebra extendida y 8.70 % de giro beta. Los estudios de acoplamiento molecular mostraron que la molécula forma un complejo estable con receptores tipo Toll 2, 4 y 9. Además, en estudios de simulación inmunológica se observó una inducción significativa de poblaciones de linfocitos Th1, células B y citocinas. Previo a la clonación *in silico* del gen de la vacuna en el plásmido pVAX1, se realizó la optimización de codones para lograr una expresión exitosa en *E. coli*. Los resultados muestran que la nanovacuna multi-epítomos diseñada, activa respuestas inmunitarias humorales y celulares, por lo que puede ser un candidato a vacuna contra la leishmaniasis cutánea.

ABSTRACT

Leishmania mexicana is a leading cause of cutaneous leishmaniasis in America, a region where 221,790 new cases of the disease were reported in 2021. The pathogen's resistance to drugs and the lack of vaccines for humans stimulate the search for alternatives to control the disease. The aim of this study is to design a multi-epitope nanovaccine against *L. mexicana* using an immunoinformatic approach. The parasite's proteome was analyzed *in silico*, identifying 55 potential stable antigens non-homologous to the human proteome. From the vaccine antigens dataset, B-cell and T-cell epitopes were predicted, from which 12 immunogenic epitopes were selected and combined into four vaccine constructs. The most stable vaccine sequence according to ProtParam calculations, named CVLm, consisted of 58.26% random coil, 14.78% alpha helix, 18.26% extended strand, and 8.70% beta turn. Molecular docking studies revealed that the molecule forms stable complexes with Toll-like receptors 2, 4, and 9. Furthermore, immunological simulation studies showed a significant induction of Th1 lymphocyte populations, B cells, and cytokines. Prior to the *in silico* cloning of the vaccine gene into the pVAX1 plasmid, codon optimization was performed to achieve successful expression in *E. coli*. The results demonstrate that the designed multi-epitope nanovaccine activates both humoral and cellular immune responses, making it a potential candidate for a cutaneous leishmaniasis vaccine.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
I.1 Generalidades de la leishmaniasis causada por <i>Leishmania mexicana</i>	2
I.1.1 Complejo de especies <i>Leishmania mexicana</i>	3
I.1.2 Epidemiología de la leishmaniasis cutánea y su distribución en México.....	4
I.1.3 Tratamiento farmacológico y control de la leishmaniasis cutánea	4
I.1.4 Respuesta inmune a la infección por <i>L. mexicana</i> en humanos.....	5
I.2 Vacunas en desarrollo contra leishmaniasis cutánea	9
I.2.1 Vacunas de primera generación.....	9
I.2.2 Vacunas de segunda generación	11
I.2.3 Vacunas de tercera generación	13
I.3 Vacunología reversa aplicada a vacunas contra la leishmaniasis	14
I.3.1 Metodología general de la vacunología reversa	14
I.3.2 Desafíos y perspectivas futuras de la vacunología reversa.....	18
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVOS	20
III.1 Objetivo general.....	20
III.2 Objetivos específicos	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
IV.1 Recuperación del proteoma de <i>Leishmania mexicana</i>	22
IV.2 Filtrado y selección de antígenos vacunales	22
IV.3 Predicción y selección de epítomos inmunogénicos	23

IV.3.1 Epítomos reconocidos por Antígeno Leucocitario Humano tipo I y tipo II	23
IV.3.2 Selección de epítomos para células B.....	24
IV.4 Construcción y caracterización de las variantes vacunales.....	24
IV.4.1 Caracterización físico-química y determinación de la antigenicidad y alergenicidad de las variantes de vacuna.....	25
IV.5 Predicción de la estructura secundaria y terciaria de CVLm	25
IV.5.2 Determinación de la estructura secundaria	27
IV.5.3 Modelado y validación de la estructura terciaria	27
IV.6 Simulaciones inmunológicas	28
IV.6.1 Simulación de acoplamiento de CVLm con receptores de la inmunidad innata.....	28
IV.6.2 Simulación de inducción de respuesta inmune adaptativa.....	28
IV.7 Optimización de codones y clonaje <i>in silico</i> de CVLm.....	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
V.1 Análisis del proteoma de <i>L. mexicana</i>	30
V.2 Antígenos de interés vacunal predichos y seleccionados <i>in silico</i>	30
V.3 Selección de epítomos reconocidos por alelos de HLA y células B	33
V.4 Diseño y caracterización de las construcciones de vacuna multi-epitópica	37
V.4.1 Características fisicoquímicas, antigenicidad y alergenicidad de las CV.	38
V.5 Estructura secundaria y modelo tridimensional de CVLm	40
V.6 Simulaciones de inducción de respuesta inmune	44
V.6.1 Acoplamiento de la CVLm con moléculas del sistema inmune innato.....	44
V.6.2 Inducción de respuesta inmune humoral y celular	46
V.7 Clonación virtual en pVAX1[+].....	46
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES.....	51
VIII. LITERATURA CITADA.....	52
IX. APÉNDICES.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos inmunológicos que conducen al control <i>L. mexicana</i> en humanos.....	6
Figura 2.	Esquema general del diseño de la vacuna multiepítomos contra <i>L. mexicana</i> a partir del proteoma del parásito.....	21
Figura 3.	Representación esquemática de las construcciones de vacuna contra <i>L. mexicana</i> ..	26
Figura 4.	Antígenos vacunales predichos a partir del genoma de <i>L. mexicana</i> U1103.	32
Figura 5.	Secuencia de la construcción de vacuna contra <i>L. mexicana</i> (CVLm).	40
Figura 6.	Predicción de la estructura secundaria de CVLm utilizando PSIPRED y SOPMA.	42
Figura 7.	Modelo tridimensional de la construcción de la vacuna refinada y evaluación de su calidad.....	43
Figura 8.	Mejores cuatro modelos de acoplamiento de CVLm con TLRs simulado en ClusPro2.0 y visualizado en Mol* 3D de PDB.	45
Figura 9.	Respuesta inmune inducida por CVLm simulada en C-ImmSim con tiempo de inyección a 0, 12 y 24 días.....	48
Figura 10.	Optimización de codones y clonación in silico de CVLm.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Vacunas en ensayos clínicos y candidatos preclínicos contra la leishmaniasis cutánea.	16
Tabla 2.	Características, herramientas y valores de corte utilizados para la búsqueda y selección de antígenos vacunales.....	22
Tabla 3.	Epítomos reconocidos por HLA-I. Se señalan en negrita los epítomos seleccionados para incluir en la vacuna.	34
Tabla 4.	Epítomos con propensión a inducir respuestas de HTL y secreción de IFN- γ . El núcleo de unión a HLA-II de cada epítomo se señala en negrita.	35
Tabla 5.	Epítomos más antigénicos reconocidos por receptores de células B.....	36
Tabla 6.	Características fisicoquímicas de las construcciones de vacuna multi-epitópica contra <i>L. mexicana</i>	39

INTRODUCCIÓN

La infección por parásitos del género *Leishmania* produce una gama de manifestaciones clínicas conocidas como leishmaniasis, con incidencia creciente a nivel mundial. Es transmitida por mosquitos flebótomos, los cuales inoculan el parásito en el torrente sanguíneo del hospedero, desencadenando así una serie de reacciones que conllevan a la multiplicación del patógeno, y por consiguiente al desarrollo de la enfermedad, ya sea en su forma cutánea, mucocutánea o visceral. La leishmaniasis forma parte del grupo de enfermedades tropicales olvidadas, pues el incentivo para investigar/desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, tratamientos o vacunas se considera bajo. A lo anterior se suma la ausencia de una vacuna para uso humano, el aumento de la transmisión por coinfección con VIH y la emergente resistencia del patógeno. Actualmente *L. mexicana* es responsable de un alto porcentaje de leishmaniasis cutánea en Mesoamérica, por lo que nos planteamos la interrogante de si es posible diseñar una nanovacuna específica para esta enfermedad, utilizando la información ómica disponible para esa especie del parásito y la biotecnología asociada. Esto permitirá de manera general, ampliar el conocimiento en la temática y, de ser efectivo, obtener un candidato capaz de prevenir las infecciones por *L. mexicana*.

I. ANTECEDENTES

En esta sección se presentan aspectos generales relacionados con la leishmaniasis, el mecanismo de infección del patógeno y los enfoques disponibles para su tratamiento. También se comentan los aspectos socio-económicos limitantes para su prevención. Por último, se revisan las vacunas anti-*Leishmania* actualmente en desarrollo.

I.1 Generalidades de la leishmaniasis causada por *Leishmania mexicana*

Se denomina leishmaniasis al espectro de formas clínicas generadas por la infección de parásitos del género *Leishmania* (familia *Trypanosomatidae*). La enfermedad es una zoonosis que afecta a seres humanos y a animales (roedores, zarigüeyas, armadillos, gatos y perros) en todo el mundo, e incluye manifestaciones clínicas que van desde lesiones en la piel (leishmaniasis cutánea, LC y mucocutánea, LMC) hasta formas más severas (leishmaniasis visceral, LV y dérmica post Kala-azar, PKDL) (Mann et al., 2021).

La LC es la presentación clínica típica de leishmaniasis. Se caracteriza por la aparición de entre una y 100 lesiones simétricas en zonas expuestas de la cara, brazos y piernas. Dichas lesiones pueden ser secas, exfoliativas, ulcerativas o nodulares, o bien pueden asemejarse a una dermatitis papular. En México, a la LC se le denomina “úlceras de Chiclero” porque fue descrita por primera vez en mexicanos “Chicleros”: trabajadores forestales de la península de Yucatán que recolectaban la goma de mascar de los árboles de chicozapote que se usaba en la confección de chicles (Eldin et al., 2021).

Las hembras de *Bicromomyia olmeca olmeca* (género *Lutzomyia*, mosquitos flebótomos, moscas de arena) son los principales agentes de transmisores de *L. mexicana*, tanto a perros como a seres humanos (Pasos-Pinto et al., 2017). Otras vías de transmisión, aunque excepcionales, incluyen transfusiones de sangre, transmisión congénita, contacto directo, ingestión e inoculación con objetos punzo-cortantes (Mann et al., 2021).

La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas (ETD), entre las que se encuentran la lepra, dengue, tracoma y enfermedad de Chagas. Prevalecen en 149 países tropicales y subtropicales distribuidos en África, Asia y las Américas, donde generan un impacto negativo en el sistema de salud y economía de los países afectados. Dentro del grupo, la leishmaniasis es una de ETD más desatendidas, ya que las herramientas de diagnóstico y tratamiento suelen ser ineficaces o tóxicas, y la mejora y el desarrollo se ven obstaculizados por la falta de financiación e I+D (PAHO, 2020).

I.1.1 Complejo de especies *Leishmania mexicana*

La taxonomía de los parásitos es compleja debido a varios factores inherentes al ciclo de vida de estos organismos, en específico a los cambios morfofisiológicos que algunos parásitos experimentan cuando pasan del vector al hospedero y viceversa. *Leishmania spp.* no es la excepción. Las especies de *Leishmania* se dividen a su vez en complejos, grupos o series de especies. Un complejo de especies se define como un conjunto informal de taxones, cuyos miembros están relacionados filogenéticamente y comparten similitudes morfológicas. Eventualmente, tales rasgos podrían considerarse insuficientes para crear nuevas categorías formales (por ejemplo, género o subgénero) para agruparlos. En algunos casos, los miembros de un complejo de especies pueden mostrar pocas o ninguna diferencia fenotípica, siendo prácticamente indistinguibles en términos morfológicos en una o más etapas de desarrollo (Sousa-Paula et al., 2021).

Se conocen más de 20 especies de *Leishmania* infecciosas para los humanos, las cuales están distribuidas en zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial. El complejo *L. mexicana* agrupa 3 especies principales (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. pifanoy*), causantes de LC localizada o difusa. *L. mexicana* a su vez agrupa a las subespecies *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana venezuelensis* (también denominada *L. venezuelensis*) y la cepa MHOM/GT/2001/U1103, cuyo genoma se encuentra disponible en la plataforma de NCBI con identificador 929439 (Rogers et al., 2011; Sousa-Paula et al., 2021). Entre estas especies existe poca variación antigénica y son morfológicamente indistinguibles, pero se pueden diferenciar por análisis de isoenzimas, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales (Hopke et al., 2021).

I.1.2 Epidemiología de la leishmaniasis cutánea y su distribución en México

Las estimaciones de la OMS para la carga de leishmaniasis oscilan entre 700.000 y 1 millón de casos nuevos por año, aunque solo el 25% de los casos se notifican a la organización. En América existen 18 países endémicos, para los cuales se reportaron 221,790 casos nuevos de LC en 2021. De estos, *L. mexicana* es responsable del 85 % de las manifestaciones cutáneas en Mesoamérica, con prevalencia en Brasil, Bolivia y Colombia (PAHO, 2020).

En México el riesgo de transmisión es bajo, con 520 casos notificados por la OPS en 2021. La mayor incidencia se reporta en la península de Yucatán (Quintana Roo y Campeche), Durango y Veracruz donde se han detectado altas tasas de mosquitos infectados tanto en la temporada lluviosa como en la seca (Pasos-Pinto et al., 2018.) (Pérez-Vega et al., 2009). En el norte, existe transmisión endémica en Sinaloa por *Culicoides furens* (Ríos-Tostado et al., 2021). La presencia de *L. mexicana* se extiende hasta Texas, EEUU, donde la LC se ha declarado como endémica en humanos, perros y gatos domésticos aunque existen discrepancias en los reportes gubernamentales (Mcilwee et al., 2018, Hopke et al., 2021).

I.1.3 Tratamiento farmacológico y control de la leishmaniasis cutánea

Los esfuerzos para controlar la leishmaniasis han aumentado en la última década como resultado de los programas de la OMS para mejorar el control, la prevención, la eliminación y la erradicación de las ETD (Ruiz-Postigo, 2021). Sin embargo, la vigilancia de la leishmaniasis rara vez se basa en la detección pasiva de casos, lo que contribuye aún más a la subestimación de su carga, al deterioro de los esfuerzos de control y a la transmisión activa del parásito. Las poblaciones pobres y/o rurales son las más vulnerables a estas infecciones y las menos propensas a tener acceso a los servicios de salud (PAHO, 2020).

Los fármacos de primera línea para tratar la LC son los compuestos de antimonio pentavalente (estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina). Además se emplean la Anfotericina B, paromicina, isetionato de pentamidina y la miltefosina. El uso de estos medicamentos presenta serios inconvenientes para los pacientes debido a su alta toxicidad, elevado costo y disponibilidad limitada en las regiones más afectadas. Por otra parte, las recaídas son comunes y se requiere terapia a largo plazo (Pinart et al., 2020).

El control eficiente de la leishmaniasis ha sido obstaculizado por la ausencia de una vacuna para uso humano, el aumento de la transmisión como resultado de coinfecciones con el VIH y la resistencia del patógeno al tratamiento farmacológico. Dadas estas circunstancias el control de la enfermedad está enfocado a: las personas (diagnóstico y tratamiento de casos), a reservorios (aplicar insecticidas y vacunas a animales domésticos), y al vector (insecticidas, control de embalses y malezas cercanos a asentamientos humanos (de Vries y Schallig, 2022).

I.1.4 Respuesta inmune a la infección por *L. mexicana* en humanos

La patogenia de *L. mexicana* y las respuestas inmunitarias (RI) que median la protección en el humano son mecanismos complejos. El conocimiento actual sobre la inmunopatología de *Leishmania* en humanos proviene principalmente de estudios sobre *L. major*, los cuales presentan patrones de respuesta distintos a los observados en *L. mexicana*. Sin embargo, el ciclo de vida del parásito es común en todas las especies de *Leishmania*. El parásito es inoculado en los vertebrados cuando una flebótomo infectada pica al hospedero varias veces para alimentarse. La saliva de los flebótomos mejora la infectividad de los promastigotes, ya que contiene vasodilatadores e inmunomoduladores (McMahon-Pratt y Alexander, 2004).

Leishmania se encuentra en forma de promastigotes flagelados en el vector. La infección se establece una vez que un flebótomo infectado inocular los promastigotes en la dermis del hospedero (Figura 1A). En consecuencia, se produce la activación del complemento seguida de la migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y monocitos que expresan CCR2 (receptor de quimiocinas del motivo C-C) al sitio de la picadura (Scott y Novais, 2016).

Los PMN ingieren y destruyen hasta el 80% de los promastigotes inoculados (Figura 1B). Sin embargo, algunos parásitos sobreviven debido a la secreción de proteínas de choque térmico, proteasas, metiltransferasas y enzimas antioxidantes que neutralizan los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (de Freitas e Silva y von Stebut, 2021). Por otro lado, estudios en *L. amazonensis* sugieren que el parásito evade el sistema del complemento al segregar la glicoproteína 63 (GP63, leishmanolisina), un receptor del factor H y, un receptor de la proteína de unión C4b que inactiva las moléculas de C4b (Filho et al., 2021; Pereira-Filho et al., 2023).

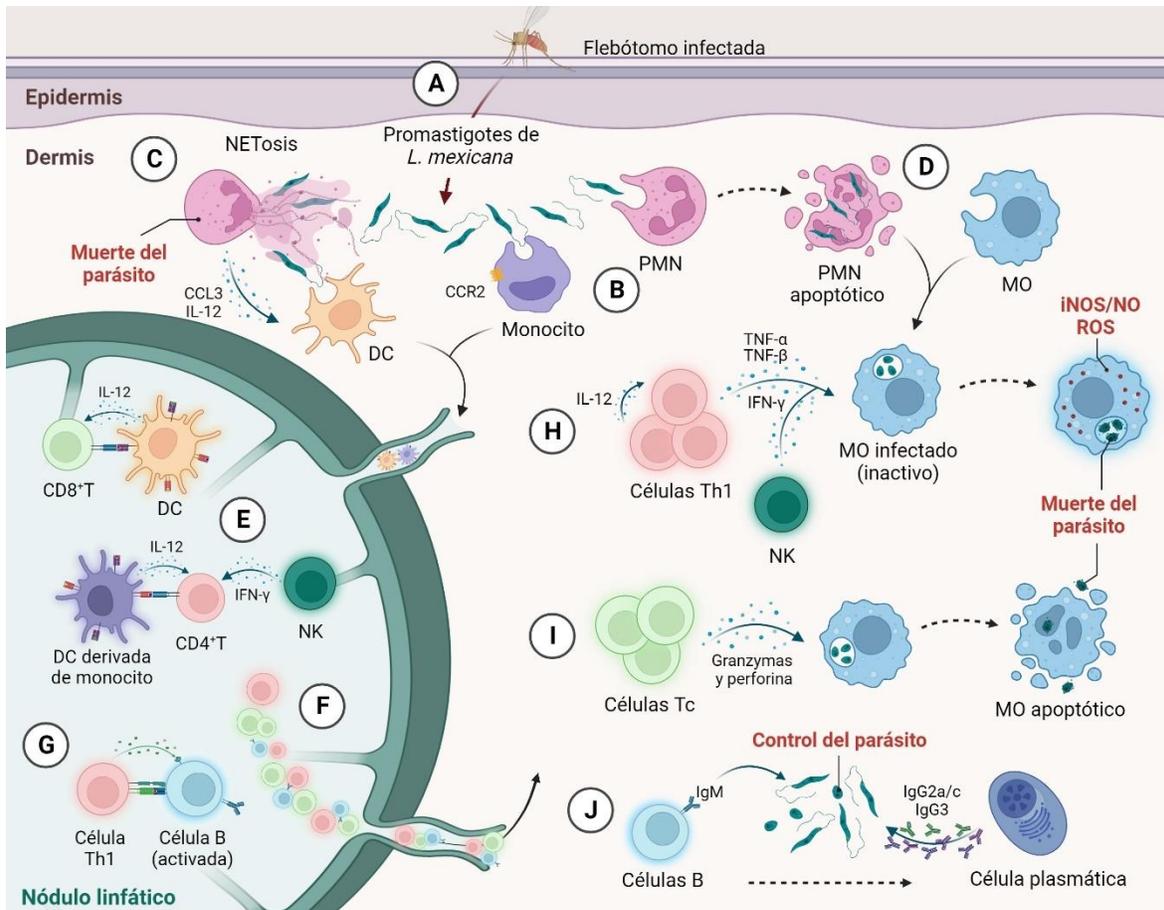


Figura 1. Mecanismos inmunológicos que conducen al control *L. mexicana* en humanos. **(A)** El parásito entra a la dermis a través de la picadura de una flebotomo. **(B)** PMN y monocitos fagocitan los parásitos. **(C)** PMN secretan NET y quimiocinas atrayentes de DC residentes. Las DC engullen los parásitos atrapados en las NETs, matándolos. **(D)** PMN infectados entran en apoptosis y los MO los fagocitan. Los parásitos fagocitados se transforman en amastigotes y se replican. **(E)** DC y monocitos procesan antígenos del parásito y migran al ganglio linfático más cercano. Ocurre la presentación de antígenos a las células T y su diferenciación en Th1 y CTL. **(F)** Las células T proliferan y migran hacia el sitio de infección. **(G)** Las Th1 activan a las células B. **(H)** Las Th1 activas secretan citocinas que inducen la producción de iNOS/NO y ROS en los MO y conducen a la muerte de los parásitos. **(I)** CTL secretan granzimas y perforinas que matan a los MO infectados y a los amastigotes en su interior. **(J)** Las células B activadas expresan IgM o se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Las líneas discontinuas indican diferenciación. Las líneas negras sólidas indican migración. Figura creada bajo licencia de BioRender.com.

Estudios *in vitro* han demostrado que la fagocitosis de los promastigotes por los PMN retrasa el reclutamiento de las células dendríticas (DC) al sitio de la infección, lo que sugiere

que los PMN son un reservorio transitorio que bloquea el inicio de la RI hasta que el parásito llega a su célula-hospedero final: los macrófagos (MO) (von Stebut y Tenzer, 2018). Los PMN además secretan trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis) donde los promastigotes quedan inmovilizados y atraen a las DC al sitio de la infección mediante quimiocinas como el ligando 3 de quimiocina (CCL3) y la interleucina (IL) 12 (Figura 1C), promoviendo el establecimiento del parásito (Elmahallawy y Alkhalidi, 2021).

Una vez fagocitados por los MO o las DC, los promastigotes se transforman en amastigotes, y pierden el flagelo (Figura 1D). Los amastigotes liberan exosomas que contienen GP63 y fosfatasa 2C, las cuales inhiben la producción de NO, regulan a la baja el complejo principal de histocompatibilidad (en lo adelante antígeno leucocitario humano I, HLA I), el antígeno de diferenciación (CD) 86 y el ligando 1 de muerte programada (PD-L1). Todo lo anterior tiene efectos negativos en los MO e impide la activación efectiva de las células T (de Freitas e Silva y von Stebut, 2021). Asimismo, GP63 desregula la NADPH oxidasa de los MO, un mecanismo que aumenta la supervivencia del parásito frente a la degradación proteolítica. Otro mecanismo de evasión de los amastigotes es la obstrucción de la secreción de IL-12 y la expresión del receptor de IFN- γ en las DC (Rossi y Fasel, 2018).

Una RI exitosa a la infección por *L. mexicana* incluye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés) a través del estallido respiratorio que ocurre durante la fagocitosis y la generación de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) activada por citocinas y quimiocinas. Esta cadena de eventos inmunológicos se da a partir de que los monocitos y DC que procesaron los antígenos de *L. mexicana*, llegan a los ganglios linfáticos periféricos donde presentan dichos antígenos a las células T CD8+ y CD4+ a través de las moléculas HLA-I y HLA-II, respectivamente (Gabriel et al., 2019).

Una presentación exitosa de antígenos HLA-célula T conduce a la activación de las células T, que se diferencian en linfocitos T auxiliares (HTL) y linfocitos T citotóxicos (CTL). Los HTL pueden diferenciarse en varios subtipos, pero los subtipos Th1 y Th2 son determinantes en el control y la progresión de la LC, respectivamente. La secreción de IL-12 por las DC durante la presentación de antígenos y la producción de IFN- γ por parte de las células asesinas naturales (NK) desencadenan respuestas polarizadas hacia Th1 (Figura 1E-1F) (B. Saha y Silvestre, 2020). En la infección por *Leishmania*, los MO tienden a secretar IL-10 en lugar de IL-12, lo

que dificulta la diferenciación de Th1 y promueve la respuesta Th2, que a su vez suprime las respuestas protectoras de IL-12 y IFN- γ (Panahi et al., 2021).

Las células Th1 y NK secretan IFN- γ , induciendo la producción de iNOS/NO en los MO infectados, lo que conduce a la eliminación del parásito (Figura 1H). Las células Th1 también secretan TNF- α , TNF- β e IL-12, que controlan la infección, suprimen las respuestas Th2 y estimulan a otras células Th1, respectivamente (Elmahallawy y Alkhaldi, 2021). Sin embargo, algunos autores han informado que *L. mexicana* sobrevive bajo respuestas Th1 limitadas, especialmente en pacientes con LC difusa (Elmahallawy et al., 2021). Además, Buxbaum et. al. (2013) demostraron que la resolución de la infección por *L. mexicana* es independiente de la IL-12. En condiciones de Th1 bajo, los amastigotes lisan los fagocitos, migran e invaden otros tejidos, causando las numerosas lesiones observadas en aproximadamente el 40% de los pacientes con LC difusa (de Freitas e Silva y von Stebut, 2021).

Los CTL también tienen un papel determinante en la progresión de la LC, ya que los pacientes con respuestas CTL deterioradas tienden a tener recaídas en la enfermedad. La actividad citotóxica de las células T a través de la granzima B contribuye a la resistencia del hospedero frente a *L. mexicana* (Figura 1I). Además, las personas afectadas por LC difusa muestran un recuento más bajo de células T CD8+ en sus lesiones que las afectadas por LC localizada. La diferencia en la progresión hacia una u otra presentación parece residir en el agotamiento de las células T CD8+, producción más baja de IFN- γ y mayor expresión de PD-1 (Li et al., 2021). Este comportamiento se puede revertir *in vitro* mediante la estimulación de la señalización del receptor de tipo Toll (TLR) 2 (Chauhan et al., 2017).

El papel de las células B en la inmunidad frente a la LC se desconoce en gran medida. A menudo las respuestas mediadas por anticuerpos se reportan como contradictorias. Sin embargo, la evidencia experimental en ratones respalda que para *L. mexicana* las respuestas de los isotipos IgG2a/c, IgG3 e IgM son decisivas para la resolución de la infección (Figura 1J), mientras que la IgG1 interfiere con la protección inmunológica.

El papel diferencial de los subtipos de IgG en la LC se explica en cierta medida por las respuestas celulares que desencadenan su secreción: los linfocitos Th2 inducen la diferenciación y proliferación de las células B secretoras de IgG1, mientras que las concentraciones plasmáticas

de IgG2a se asocian con respuestas de tipo Th1 (Figura 1G) (Buxbaum, 2013; Panahi et al., 2021). Además, estudios *in vivo* en ratones knockout (KO) para IgG1 muestran que IgG2a induce la fagocitosis en las DC y los monocitos (Abadías-Granado et al., 2021), lo que sugiere su efecto protector.

I.2 Vacunas en desarrollo contra leishmaniasis cutánea

La vacunación es la herramienta más rentable para el control y prevención de la leishmaniasis en áreas endémicas (de Vries y Schallig, 2022). Una vacuna ideal contra la LC debe cumplir requisitos sanitarios como: (i) un buen perfil de seguridad, (ii) mínimo número de inmunizaciones, (iii) rentabilidad, (iv) eficacia profiláctica o terapéutica, (v) entrega antigénica eficiente y (vi) no requerir cadena de frío (Abadías-Granado et al., 2021). Como se señaló anteriormente, la protección contra *L. mexicana* ocurre predominantemente a través de la inmunidad celular, la cual disminuye más rápido que las respuestas de anticuerpos. Por lo tanto, la inducción de memoria inmunológica plantea un problema para la eficacia de vacunas anti-*Leishmania*.

Aunque aún no hay una vacuna para uso humano, los avances reportados en ensayos clínicos son esperanzadores para su desarrollo en el futuro (Tabla 1). Esta sección examina el desarrollo actual de vacunas contra la LC y discute algunos desafíos pendientes para obtener vacunas efectivas en humanos.

I.2.1 Vacunas de primera generación

Las vacunas de primera generación están compuestas por microorganismos vivos, atenuados o muertos. Las vacunas vivas no requieren adyuvantes para inducir RI robustas, sin embargo, su uso está limitado debido a preocupaciones éticas y de seguridad. La vacunación con parásito vivo (leishmanización, LZ), se ha practicado durante siglos, aunque actualmente no se recomienda debido a problemas de seguridad (Pacheco-Fernandez et al., 2021). Sin embargo,

no hay evidencia que demuestre que la LZ sea protectora contra especies de *Leishmania* presentes en América (Volpedo et al., 2022a).

Los parásitos vivos pueden atenuarse mediante métodos físicos, químicos o genéticos. Las vacunas atenuadas activan tanto respuestas inmunitarias celulares como humorales, induciendo una protección duradera (Coutinho De Oliveira et al., 2020), por lo que este método ha sido respaldado por varios autores. La vacunación de ratones BALB/c con líneas atenuadas de *L. mexicana* con gentamicina induce una protección significativa y una reducción de lesiones al desafiar con parásitos de tipo salvaje (Daneshvar et al., 2003). Desafortunadamente, las vacunas atenuadas presentan inconvenientes en cuanto a la estandarización para la producción a gran escala, la reversión de la virulencia o la atenuación incompleta y las diferencias en la protección entre ensayos preclínicos y clínicos. Sin embargo, la atenuación mediante modificación genética podría contribuir a mantener la inmunogenicidad y la potencia de la vacuna, asegurando que no haya reversión de la virulencia (Zabala-Peñañiel et al., 2020b).

La secuenciación del genoma de varias especies del complejo *L. mexicana* ha permitido su atenuación genética. Por ejemplo, en modelos preclínicos se ha demostrado la inducción de respuestas Th1 utilizando *L. mexicana* deficiente de cisteína proteinasa obtenidos mediante mutagénesis dirigida (Pollock et al., 2003; Saravia et al., 2006; Souza et al., 1994). Del mismo modo, *L. mexicana* deficiente en Centrina mediante CRISPR/Cas9 es protectora contra LC y LV en ratones y hámsteres, respectivamente (Karmakar et al., 2022; Volpedo, et al., 2022). Sin embargo, Ishemgulova et al. (2018) demostraron que cepas de *L. mexicana* KO para un factor de virulencia putativo predicho *in silico*, no alteran la colonización ni en el vector ni en ratones, lo que destaca la importancia de la validación experimental de los factores de virulencia predichos mediante bioinformática.

Por su parte, las vacunas de parásitos muertos tienen una buena antigenicidad y costos de producción bajos. La efectividad de los candidatos de vacunas muertas se ha demostrado mediante la aplicación preventiva de promastigotes de *L. mexicana* autoclavados combinados con BCG (Bacillus Calmette-Guerin) o con *L. amazonensis* (Convit et al., 2004). La vacunación con *L. amazonensis* autoclavado (Leishvaccin®) se ha utilizado en países de América del Sur, donde se reporta cierta protección cruzada con otras especies del complejo *L. mexicana*. Sin embargo, los parásitos autoclavados pierden potencia con el tiempo, por lo que estas

formulaciones se aplican combinadas con fármacos. Actualmente, los esfuerzos se centran en mejorar y desarrollar inmuno-quimioterapias (Coutinho De Oliveira et al., 2020).

I.2.2 Vacunas de segunda generación

Las vacunas de segunda generación consisten en proteínas conjugadas o recombinantes, denominadas vacunas de subunidades. Aunque no confieren inmunidad duradera, son más seguras, mejor toleradas y están mejor caracterizadas que las vacunas de células completas (Tahamtan et al., 2017). Existen varios candidatos de segunda generación contra la LC en ensayos clínicos: proteínas nativas o fraccionadas del parásito y del vector, combinaciones de poliproteínas y sistemas de entrega que expresan o transportan antígenos de *Leishmania* (Moafi et al., 2019).

Los antígenos crudos (proteína nativa) del patógeno son un enfoque de segunda generación contra la LC. El lipofosfoglicano (LPG) de *L. mexicana* y *L. amazonensis* se ha probado como vacuna experimental, aunque los resultados son contradictorios cuando se utilizan diferentes vías de administración (Pinheiro et al., 2007; Martínez Salazar et al., 2014). Dado que la leishmanolisina es inmunogénica en todas las especies de *Leishmania*, la proteína GP63 nativa se ha probado en formulaciones liposomales, induciendo una fuerte protección y respuestas de células T en ratones incluso con dosis bajas de antígeno (Askarizadeh et al., 2017).

Hasta la fecha, tres vacunas de proteínas fraccionadas y recombinantes han sido autorizadas en Europa y Brasil para prevenir/tratar la LC en perros (Canileish®, Leish-Tec® y Letifend®) (Moafi et al., 2019), lo que respalda la viabilidad de una vacuna para humanos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las proteínas recombinantes de *Leishmania* son caras de producir a gran escala con la tecnología disponible, por lo que son inviables para la vacunación masiva en los países más afectados. Por lo tanto, es preferible diseñar vacunas poli-epitópicas utilizando combinaciones de epítomos conservados ya sea del parásito o del vector. Las moléculas poli-epitópicas tienen una mayor inmunogenicidad, una cobertura poblacional y de especies más amplia y menos riesgo de reacciones adversas en comparación con las proteínas nativas (Cecílio et al., 2020).

Algunos candidatos poli proteicos han progresado hasta ensayos clínicos en humanos con éxito variable. En este caso, la vacuna Leish-111f (LEISH-F1) fue la primera proteína recombinante en avanzar a ensayos clínicos en humanos de fase I y II, donde demostró ser segura, bien tolerada e inmunogénica contra LMC cuando se usó en combinación con quimioterapia (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00121849>, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00111553>). Para *L. mexicana*, las mezclas de proteínas recombinantes adyuvadas con IL-12 han mostrado resultados prometedores en ratones C57B/L (Aebischer et al., 2000). De manera significativa, se han obtenido polipéptidos/dominios de proteínas recombinantes y mutantes de nucleósido hidrolasa 36 (NH36) que inducen respuestas Th1 en pacientes brasileños curados/expuestos en áreas endémicas de *L. braziliensis* (Alves-Silva et al., 2019).

Otro enfoque de segunda generación es el uso de vacunología inversa (VR) para diseñar candidatos basados en péptidos sintéticos y quiméricos. Ejemplos de estrategias de VR aplicadas a la leishmaniasis son el mapeo *in silico* de epítomos mediante la predicción de unión a HLA (Rezvan et al., 2012), la selección de antígenos conservados mediante análisis filogenéticos y la predicción de la localización/función de proteínas hipotéticas (Germanó et al., 2022). Los péptidos sintéticos tienen una gran versatilidad para adaptarse a sistemas de entrega innovadores como son las nanopartículas (nanovacunas), donde cada vez ganan más adeptos respecto al tratamiento y prevención de la LC (Santana et al., 2021). Por citar dos ejemplos, se ha demostrado la capacidad adyuvante de nanopartículas al reconstituir GP63 de *L. mexicana* en liposomas y la efectividad tópica de nano-transfersomas cargados con medicamentos contra *L. mexicana* (Chaudhuri et al., 1989; Dar et al., 2020).

De manera similar, los virus y las bacterias que expresan proteínas del complejo de especies *L. mexicana* son sistemas prometedores de administración de vacunas. La proteína de superficie de promastigote de *L. amazonensis* expresada en virus vaccinia (McMahon-Pratt et al., 1993) y la GP63 recombinante clonada en BCG o en *Salmonella thypi* CVD 908 (González et al., 1998) son algunos ejemplos. Ambos candidatos inducen protección en ratones, sin embargo los vectores bacterianos y virales presentan limitaciones para las vacunas humanas. En este sentido, los principales desafíos son el establecimiento de correlatos de protección entre el modelo animal y los humanos, así como el escalado a la producción industrial (Palatnik-de-Sousa, 2008).

I.2.3 Vacunas de tercera generación

Las vacunas de tercera generación están compuestas por ácidos nucleicos, los cuales pueden administrarse desnudos o mediante un sistema de entrega. Este enfoque es ventajoso debido a que la vacuna tiene una composición antigénica simple y generalmente es estable a temperatura ambiente. Además, la posibilidad de combinar varios epítomos en una sola formulación puede inducir protección cruzada contra diferentes especies de *Leishmania* que no estén relacionadas antigénicamente (Cecílio et al., 2020). La evidencia preclínica indica que las vacunas genéticas, así como los péptidos derivados de las mismas inducen inmunidad robusta y protección en humanos frente a múltiples enfermedades (Graña et al., 2022).

Particularmente para la LC en América, la NH36 es la proteína más probada como vacuna plasmídica. El candidato de ADN plasmídico VR1012-NH36 se ha probado en ratones BALB/c, en los cuales demostró protección cruzada contra *L. chagasi* y *L. mexicana* (Aguilar-Be et al., 2005). Otros genes clonados en VR1012 son los que codifican para GP63, LACK (homólogo de *Leishmania* de los receptores para la proteína quinasa C activada), CPb (cisteína proteinasa b) o GP46. Los mismos se han probado como vacunas de ADN contra *L. mexicana* en modelo murino, induciendo protección parcial en todos los casos (Dumonteil et al., 2003).

Aún más, Vallado et al. (Rosado-Vallado et al., 2005) demostraron que una vacuna de ADN de GP63 de *L. mexicana* adyuvada con aluminio induce una respuesta inmunitaria celular incluso a dosis bajas de inmunógeno, lo que sugiere la importancia de emplear un adyuvante para mejorar la RI. El gen de una fosfatasa ácida de *L. mexicana* predicha *in silico*, clonado en pVAX1 es otro candidato con efecto protector en ratones (Burgos-Reyes et al., 2021).

La baja inmunogenicidad es un desafío importante para el uso práctico de las vacunas de ADN de plásmidos desnudos. Este problema podría ser causado por la degradación del plásmido por nucleasas y su posterior eliminación, la dificultad para penetrar las membranas celulares, su naturaleza hidrofílica y la incapacidad para ser reconocido por las células dendríticas. Otras preocupaciones con las vacunas de ácidos nucleicos son la posible recombinación con el genoma del huésped y los eventos inmunológicos asociados con el aumento de la enfermedad. Por otro lado, algunos genes presentan una baja eficacia de transfección y una expresión génica corta, lo

que plantea un problema sustancial para la fabricación a escala industrial (Tejeda-Mansir et al., 2019; Akbari et al., 2021).

Desafortunadamente, el fracaso de varios candidatos a vacunas genéticas demuestra que la protección contra la leishmaniasis es más compleja de lo que se pensaba originalmente. Por lo tanto, actualmente se exploran enfoques alternativos en modelos animales. La inmunoterapia con DC es una de las variantes más utilizadas, ya sea mediante sobreexpresión de IL-12 o mediante exosomas de DC expuestas a lisados de *Leishmania*. Además, las DC cargadas con GP63, péptidos multi-epítomos o con oligonucleótidos CpG estimulan la respuesta Th1 en ratones (Moll y Berberich, 2001). Por último, el bloqueo de IL-10 ha demostrado efecto terapéutico en la LC humana, mientras que los ratones deficientes en TLR-2 infectados con *L. mexicana* han mostrado exacerbación de la enfermedad debido a una respuesta predominante de Th2 (Castellano et al., 2015).

I.3 Vacunología reversa aplicada a vacunas contra la leishmaniasis

La VR implica el descubrimiento de nuevos epítomos de células B y T a través de la bioinformática, la proteómica y la genómica comparativa y funcional. Esta metodología permite el mapeo y selección de diversos antígenos y, se ha vuelto extremadamente útil en la investigación y desarrollo de vacunas. Con este enfoque se han desarrollado vacunas contra patógenos como meningococo serogrupo B, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos de los grupos A y B (Seib et al., 2012). Además, esta tecnología ha acelerado el desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2 y la inmunoterapia del cáncer, por lo que tiene un gran potencial para mejorar la salud pública mundial (Cianci y Franza, 2022).

I.3.1 Metodología general de la vacunología reversa

El diseño de vacunas mediante VR parte de recuperar datos genómicos de bases de datos en línea públicas (BD), como UniProtKB o NCBI. Aunque existen brechas en el conocimiento del

metabolismo y la patogenicidad de *L. mexicana*, es posible acceder a una gran cantidad de datos a través de BD, como son LeishInDB, TriTrypDB y RefSeq (Pacakova et al., 2022).

El genoma de *L. mexicana* comprende en promedio 8249 genes, sin embargo, no todos son inmunológicamente relevantes y la expresión génica varía según la etapa del ciclo de vida del parásito (Rogers et al., 2011). Considerando esto, se debe realizar un análisis exhaustivo para identificar qué genes están relacionados con la enfermedad e inducen RI celular o protección.

Respecto a *Leishmania*, es preferible seleccionar antígenos expresados constitutivamente durante etapas críticas del ciclo de vida, es decir, la transición de promastigote a amastigote, la invasión y la supervivencia del parásito. Además, analizar la conservación a nivel de especie y las estructuras tridimensionales de las proteínas involucradas en la patogénesis, ofrece información valiosa sobre los motivos responsables del reconocimiento inmunológico, lo que ayuda en la predicción de epítomos (Akpunarlieva et al., 2017; Martinelli, 2022).

Varios autores han desarrollado metodologías de inmunoinformática para diseñar vacunas contra LC (Akyra et al., 2019; Khan et al., 2020; Motamedpour et al., 2020; Burgos-Reyes et al., 2021). El éxito de las mismas depende de la especie de parásito, así como de la población objetivo, la precisión de las plataformas/herramientas utilizadas, el orden en que se utilizan y la plataforma de vacuna seleccionada. No obstante, hay criterios comunes para la predicción de candidatos vacunales, entre ellos la antigenicidad, la alergenicidad, la inmunogenicidad, la localización subcelular, la función putativa, la conservación, el número de hélices transmembrana y características fisicoquímicas como la hidrofobicidad (Rajkhowa et al., 2021).

La predicción de epítomos inmunogénicos dentro de los antígenos es vital para el diseño de vacunas. Estos cálculos se realizan normalmente mediante herramientas bioinformáticas disponibles en línea o programas autónomos que utilizan redes neuronales artificiales, algoritmos basados en homología o en la estructura, Inteligencia Artificial previamente entrenada, entre otros algoritmos. A su vez, los epítomos predichos se pueden modelar tridimensionalmente con el fin de visualizar las superficies expuestas, bucles y posibles sitios de interacción (Woolums y Swiderski, 2021).

Una vez que se han seleccionado los epítomos, se ensamblan en una construcción sintética, ya sea añadiéndolos uno al lado del otro o utilizando espaciadores, también conocidos como enlazadores. Los espaciadores aumentan la estabilidad de la proteína y evitan la expresión de antígenos superpuestos inmunodominantes, por lo que su uso está muy extendido. Además, se pueden incluir etiquetas o marcadores que faciliten la purificación, péptidos inertes que proporcionen volumen a la molécula final así como adyuvantes o co-estimuladores de la RI (Khan y Kumar, 2021).

Tabla 1. Vacunas en ensayos clínicos y candidatos preclínicos contra la leishmaniasis cutánea.

Vacuna	Composición	Fase ensayo clínico	Resultados
LZ	L. major vivo	-	Descontinuado por seguridad, RI protectora y duradera
Leishvaccin	L. amazonensis muerto +III BCG		Activación de células T y B, requiere múltiples dosis
CaniLeish	LiESP + QA-21	III	Respuesta Th1, requiere múltiples dosis
Leish-Tec	Proteína A2 de <i>L. donovani</i> + saponina	III	Activación de células T
LEISH-F1	TSA, LmSTI1, LeiF + MPL-SE	II	Respuesta de células T, IL-5, IFN- γ , y anticuerpos, requiere cadena de frío
LEISH-F2	Antígenos modificados de LEISH-F1	II	Respuesta de IgG, IL-10, e IFN- γ , requiere cadena de frío
SMT + NH	SMT, NH recombinante + GLA-SE	I	Activación de células T
<i>L. mexicana</i> modificado genéticamente	LmexCen-/-	Preclínica	RI similar a infección natural, riesgo de reversión a virulencia
	Δ GDP-MP (vivo atenuado)	Preclínica	Protección duradera en ratones, riesgo de reversión a virulencia
	Δ lmlpg2 y Δ CPB	Preclínica	No protección en ratones. Mutantes y WT indistinguibles

Línea H de L. mexicana	<i>L. mexicana</i> atenuado con gentamicina	Preclínica	Protección mediada por Th1 en ratones
CVD908-MGP63	Δ aroC:: <i>P_{tac}</i> -gp63	Preclínica	Protección frente a LC activa en ratones, protección parcial en monos sin adyuvante

Guía de abreviaturas: QA-21, Fracción purificada de saponina; BCG, Bacilos Calmette–Guérin; FML, Ligando de fucosa-manosa; TSA, homólogo de *L. major* del antioxidante tioletpecífico eucariótico; LmSTI1, Proteína 1 inducida por estrés de *L. major*; LeIF, Factor de elongación e iniciación de *L. braziliensis*; NH, nucleósido-hidrolasa; SMT, Esterol 24-c-metiltransferasa; GLA- SE, Nanoemulsiones de glucopiranosil lípido A en agua; MPLSE, estructura de monofosforil lípido A estimuladora de receptores tipo Toll (TLR); KMP- 11, Proteína 11 de membrana de kinetoplástidos; HASPB, Proteína hidrofílica acilada de superficie B.

Las vacunas diseñadas mediante VR deben validarse estructuralmente con el fin de asegurar su estabilidad y desempeño apropiados. En este sentido, el análisis de la estructura secundaria y terciaria de la construcción de vacuna son críticos. Aunque hay varias herramientas disponibles para dichos análisis, los modelos generados tienden a diferir considerablemente entre sí dependiendo de la secuencia de aminoácidos del péptido, el algoritmo de cada programa, los parámetros y las opciones de visualización elegidos (Lee et al., 2022). Por lo tanto se sugiere comparar los modelos 3D obtenidos con varias herramientas y validar la estructura mediante gráficos de Ramachandran y parámetros estadísticos (Khan y Kumar, 2021). Por otro lado, es necesario verificar que los epítomos contenidos en la vacuna se unan adecuadamente a los receptores inmunes e induzcan RI, lo cual es posible mediante simulaciones de acoplamiento y ensayos de inmunogenicidad (Rapin et al., 2010).

Las vacunas obtenidas con VR se pueden administrar como vacunas peptídicas o como vacunas de ácidos nucleicos. Ambos enfoques requieren la optimización del uso de codones en el gen, por lo que el péptido debe ser retro-transcrito a ADN. Además, es recomendable repetir la predicción alérgica para prevenir posibles reacciones de hipersensibilidad (Ropón-Palacios et al., 2019).

I.3.2 Desafíos y perspectivas futuras de la vacunología reversa

Las ventajas definitivas de la VR son la rapidez, la precisión y la eficiencia en comparación con el enfoque convencional, lo cual es deseable en la investigación de ETD. Además, las vacunas de nueva generación diseñadas mediante herramientas *in silico* han demostrado ser seguras, estables y eficientes en la vacunación humana y animal (Rawal et al., 2021).

Sin embargo, los métodos *in silico* tienen inconvenientes. La VR no es inherentemente aplicable a antígenos vacunales que ya están bien definidos, ya que pueden presentar una variabilidad excesiva, estructuras complejas o inestabilidad en la unión que dificulta la simulación dinámica de la estructura. Como resultado, los péptidos de la misma proteína pueden ser drásticamente diferentes cuando se sintetizan (Hidalgo-Ruiz et al., 2022; Van Regenmortel, 2016). En consecuencia, todos los epítomos o vacunas obtenidos *in silico* deben ser probados *in vivo* para determinar su inmunogenicidad.

Aunque los métodos *in silico* tienen limitaciones, su constante mejora a través del desarrollo de código y la validación experimental ha posicionado a la bioinformática como una herramienta importante para el diseño racional de vacunas. La construcción de decenas de vacunas para *Leishmania* en los últimos 10 años así lo prueba. El descubrimiento de nuevos candidatos vacunales para *L. mexicana* no es un proceso sencillo, sin embargo, las herramientas bioinformáticas combinadas con la ingeniería genética tienen un gran potencial para lograrlo debido a su versatilidad y constante mejora. Por otra parte, se necesitan más datos experimentales para mejorar la precisión de las predicciones y la toma de decisiones en cuanto a la selección de epítomos y candidatos (Liljeroos et al., 2015).

II. HIPÓTESIS

A partir del análisis bioinformático del proteoma de *Leishmania mexicana*, es posible diseñar una nanovacuna multi-epitópica que induzca respuesta inmune celular y humoral en simulación dinámica.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Diseñar una nanovacuna multi-epitópica contra *Leishmania mexicana*.

III.2 Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* el proteoma de *Leishmania mexicana* para identificar proteínas antigénicas.
2. Determinar la presencia de epítomos inmunogénicos en los antígenos seleccionados para construir variantes de nanovacuna multi-epitópica.
3. Seleccionar la construcción de vacuna más estable *in silico*.
4. Evaluar la inducción de respuesta inmune *in silico* y la clonación virtual de la nanovacuna.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los métodos que se utilizaron en la presente investigación (Figura 2). Los enlaces de acceso a las bases de datos, plataformas y herramientas bioinformáticas empleadas se relacionan en el apéndice 1.

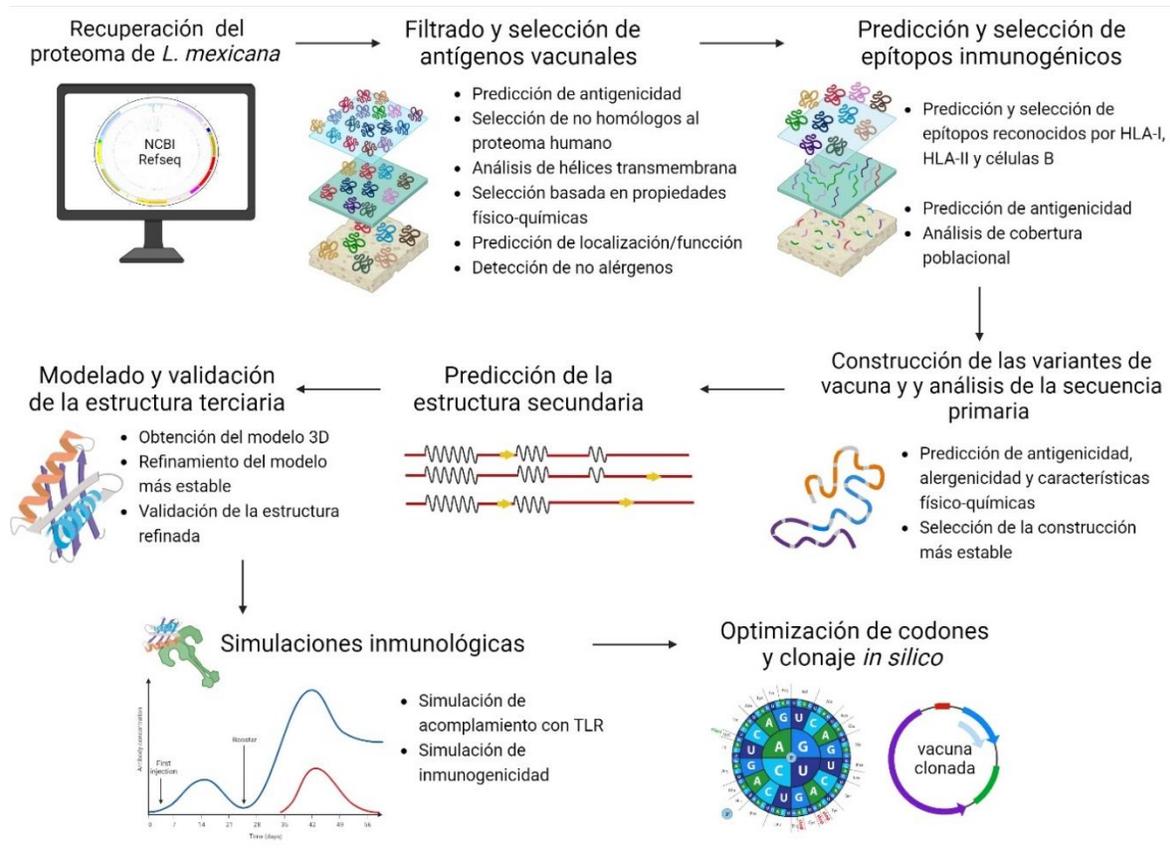


Figura 2. Esquema general del diseño de la vacuna multiepitopos contra *L. mexicana* a partir del proteoma del parásito. Figura creada bajo licencia de BioRender.com.

IV.1 Recuperación del proteoma de *Leishmania mexicana*

Se recuperó el proteoma completo de *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103 a través de la herramienta Entrez de la base de datos RefSeq en formato FASTA y se eliminaron las secuencias redundantes.

IV.2 Filtrado y selección de antígenos vacunales

Del proteoma de la cepa tipo se seleccionaron las proteínas de interés vacunal de acuerdo con las características descritas en la Tabla 2, las cuales han sido validadas por otros autores para la búsqueda *in silico* de antígenos proteicos (Rawal et al., 2021).

Tabla 2. Características, herramientas y valores de corte utilizados para la búsqueda y selección de antígenos vacunales. Las características se enumeran en el orden en que se utilizaron.

Característica	Herramienta	Valor de corte
Antigenicidad	VaxiJen v2.0	> 0.6
Hélices transmembrana	TMHMM TOPCONS	≤ 1
No homología con proteoma humano	BLASTp	E: 0,005; Identidad $\geq 30\%$; cobertura $\geq 70\%$
No alergenicidad	AlgPred 2	Por defecto
Proteína de secreción	SecretomeP 2.0	≥ 0.6
Anclaje a Glicofosfatidil inositol	NetGPI1.1	Por defecto (p > 99.5%)
Localización subcelular	DeepLoc 2.0 CELLO v2.5	Extracelular o membrana citoplasmática
Estabilidad	ProtParam	Índice de inestabilidad < 40
Peso molecular	ProtParam	< 110 kDa

A partir de los antígenos no alergénicos y no homólogos a los humanos se construyó una base de datos para la predicción de proteínas de secreción, anclaje a glicofosfatidilinositol (GPI) y localización subcelular de los antígenos. Del conjunto de proteínas extracelulares y de

membrana citoplasmática se creó un archivo FASTA que se utilizó como entrada para la predicción de epítomos inmunogénicos.

IV.3 Predicción y selección de epítomos inmunogénicos

Con el fin de seleccionar los epítomos más inmunogénicos, se construyó una base de datos con los alelos de HLA I y II más frecuentes en México (Barquera et al., 2020). Además se tuvo en cuenta el alelo HLA-DRB1*04:07, considerado un inductor de susceptibilidad a la infección por *L. mexicana* (de Vrij et al., 2021). Los epítomos reconocidos por este alelo se eliminaron de la selección de epítomos para la vacuna.

IV.3.1 Epítomos reconocidos por Antígeno Leucocitario Humano tipo I y tipo II

La predicción de los epítomos de HLA clase I (9 residuos) se realizó en el servidor NetMHCpan-4.1, el cual utiliza redes neuronales artificiales (ANN, del inglés) para sus predicciones (Reynisson et al., 2020). Los epítomos más inmunogénicos se seleccionaron de acuerdo a lo planteado por Singh et al (2020a), para lo cual se estableció el umbral de afinidad de unión ($Aff \leq 500$ nM) y el rango percentil < 0.5 . Los péptidos que cumplieron con estos parámetros y que fueron reconocidos por dos o más alelos de HLA se examinaron por su inmunogenicidad, procesamiento del antígeno y antigenicidad en IEDB (International Epitope Database) y VaxiJenv2.0, respectivamente. La selección final de los epítomos vacunales se hizo a través del análisis conjunto de todos los parámetros evaluados.

En el caso de los epítomos para HLA clase II (15 residuos) se predijo en NetMHCpanII-4.0. Este programa calcula la probabilidad de que un péptido sea presentado de manera natural por uno o más receptores de HLA-II a través de ANN previamente entrenadas con datos de elución de ligandos mediante espectrometría de masas (Reynisson et al., 2020). Para la selección de ligandos fuertes se seleccionó un rango percentil máximo de 1, el cual es el umbral por defecto de este parámetro en el servidor. A partir de los epítomos promiscuos (reconocidos por más de dos alelos) con unión fuerte a HLA-II se creó un archivo FASTA, el análisis de inducción

de IFN- γ en IFNepitope. Finalmente, se seleccionaron los mejores inductores de IFN- γ (índice de IFNepitope positivo) y se predijo su antigenicidad.

IV.3.2. Selección de epítomos para células B

En paralelo, los antígenos vacunales se analizaron en cuanto al reconocimiento por receptores de células B (BCR) a través de los servidores BepiPred3.0 y ABCpred. En ambos casos se restringió la predicción a péptidos de 20 aminoácidos, con un umbral de unión de 0.8 para ABCpred y 0.2 para BepiPred3.0. Luego de realizadas las predicciones, se compararon los resultados de los dos programas mediante alineamiento de secuencias (BLASTp) con el fin de seleccionar los epítomos predichos por ambos algoritmos. Finalmente, los epítomos redundantes se examinaron por su antigenicidad y alergenicidad.

IV.4 Construcción y caracterización de las variantes vacunales

Una vez realizada la predicción epitópica, se seleccionaron definitivamente las secuencias a incluir en la vacuna multi-epitópica. Para ello primero se diseñaron variantes de vacuna teniendo en cuenta la inclusión o no de un adyuvante. La selección de adyuvantes, enlazadores y estructuras accesorias se realizó con base en evidencia experimental y bioinformática reportada por otros autores (Yang et al., 2015; Alexander et al., 2000; Bibi et al., 2021); teniendo en cuenta el tipo de respuesta inmune que inducen, sus características fisicoquímicas y su uso previo en otras vacunas contra *Leishmania*.

Luego de seleccionar la plataforma de vacuna más adecuada para ensamblar los epítomos, se diseñaron cuatro variantes de construcción vacunal (CV) (Figura 3). Las CV constan de 12 epítomos ordenados según su receptor inmune de mayor a menor índice de antigenicidad. Los 4 epítomos HTL se colocaron hacia el extremo C-terminal, seguidos por 4 epítomos CTL y 4 de células B. Los epítomos HTL, CTL y B se conectaron mediante enlazadores GPGPG o AAY, GGGS y KK, respectivamente.

De las cuatro variantes, dos incluyen un trímero unido a un pentámero entre los epítomos de CTL y B (CV1 y CV3), el cual fue propuesto por Singh et al (2020a) como una estructura estabilizadora de proteínas quiméricas. Además, se añadió el adyuvante PADRE (epítomo pan DR) antes de los epítomos HTL, a través de un enlazador rígido EAAAK, esto con el fin de potenciar la inmunogenicidad de la proteína quimérica. En el extremo N-terminal, después de los epítomos B se unió una etiqueta de 6-His para mejorar la capacidad de purificación de las CV.

IV.4.1 Caracterización físico-química y determinación de la antigenicidad y alergenicidad de las variantes de vacuna

La secuencia de cada construcción vacunal se analizó en ProtParam y ProteinSOL para determinar propiedades fisicoquímicas basadas en la secuencia primaria. Las características incluyen el punto isoelectrico (pI) hipotético, el peso molecular, el índice de hidrofobicidad promedio general (GRAVY), el índice alifático, la vida media en solución *in vitro* e *in vivo*, la polaridad de los aminoácidos, la solubilidad y el índice de inestabilidad.

Además, se evaluó la alergenicidad de las CV mediante AlgPred2 con el valor de corte predeterminado para el algoritmo híbrido (0.3). La antigenicidad se determinó utilizando VaxiJen v2.0, donde se definió un umbral de 0.6 y se seleccionó “Parásito” como organismo modelo.

Una vez caracterizadas las variantes, se compararon los resultados y se seleccionó la variante de vacuna con parámetros físico-químicos y de solubilidad más cercanos a los reportados como óptimos para vacunas (Khan y Kumar, 2021). En adelante, se hará referencia a la construcción seleccionada como CVLm (candidato vacunal contra *L. mexicana*).

IV.5 Predicción de la estructura secundaria y terciaria de CVLm

Se predijo la estructura secundaria de CVLm con la finalidad de obtener información preliminar sobre su conformación y elementos estructurales básicos. Esta información se utilizó como base para la predicción de la estructura terciaria y el análisis del modelo 3D de la nanovacuna.

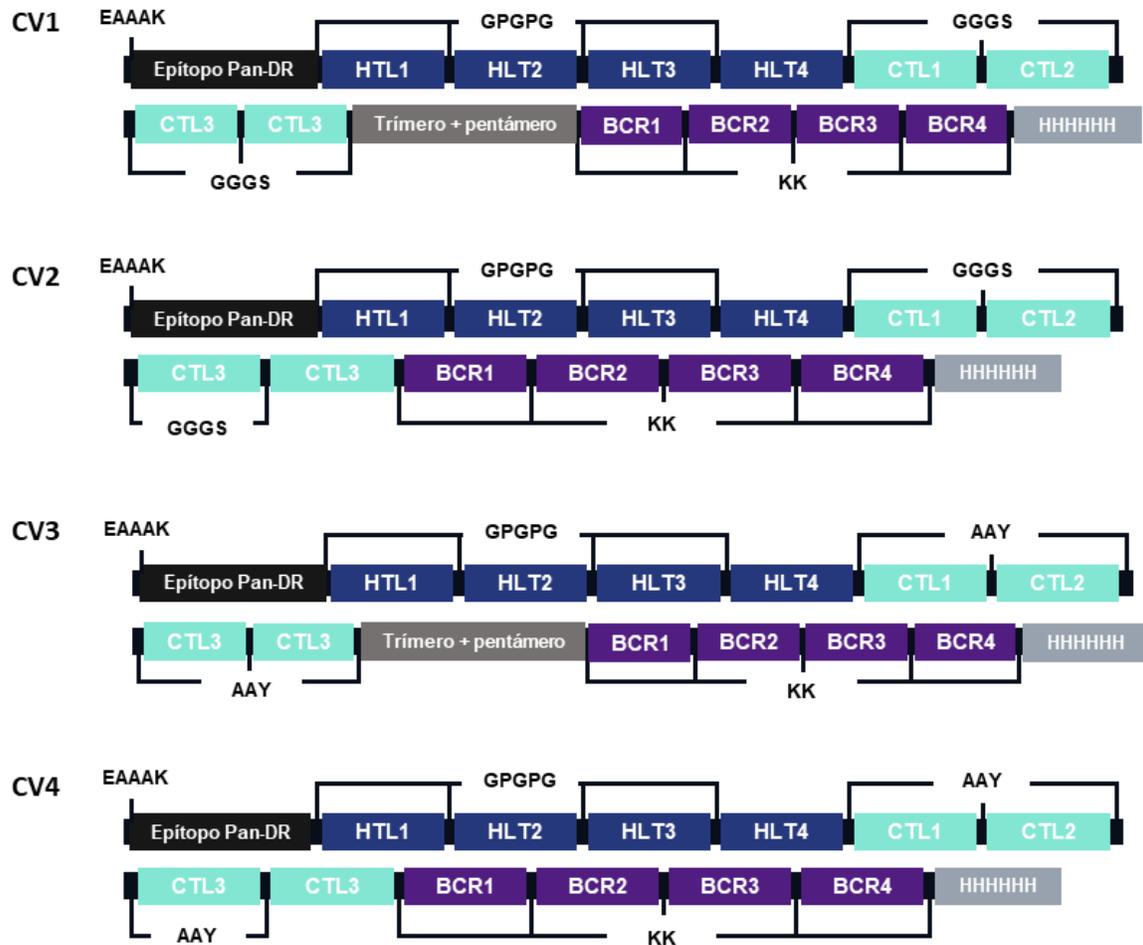


Figura 3. Representación esquemática de las construcciones de vacuna contra *L. mexicana*. Se agregó un enlace EAAAK en el extremo N-terminal, seguido del adyuvante PADRE (negro). Los epítomos HTL (azul oscuro) se conectaron mediante enlaces GPGPG, los epítomos CTL (cian) a través de GGGG (en CV1 y CV2) o AAY (en CV3 y CV4). Los epítomos de células B (BCR, morado) se enlazaron con KK. La secuencia de trímero unido a pentámero (gris oscuro) se intercaló entre los CTL y BCR en las construcciones 1 y 3. Una etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal (gris) se añadió mediante un enlazador KK.

IV.5.2 Determinación de la estructura secundaria

La estructura secundaria de la proteína se obtuvo en PSIPRED 4.0 (Predict Secondary Structure) y SOPMA a través del servidor NPS@ (Network Protein Sequence Analysis). Esta plataforma consta de varias herramientas y algoritmos para predecir características proteicas como la estructura secundaria a partir de la secuencia primaria de la proteína. Específicamente, SOPMA utiliza un método de predicción se optimiza automáticamente para cada secuencia, con un enfoque basado en alineamientos múltiples (Geourjon y Deléage, 1995). PSIPRED, por otra parte, basa sus predicciones en redes neuronales, las cuales distinguen regiones de hélice alfa, hojas beta y enrollamiento aleatorio con una precisión mayor al 70% (McGuffin et al., 2000).

IV.5.3 Modelado y validación de la estructura terciaria

El modelo tridimensional de CVLm se obtuvo en I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) utilizando la opción III del algoritmo, donde se introdujeron los datos de estructura secundaria de PSIPRED para cada aminoácido. I-TASSER es un algoritmo basado en repliegue de fragmentos que consta de cinco pasos: (i) identificación de fragmentos, (ii) ensamble por repliegue, (iii): optimización y refinamiento y (iv) generación de modelos finales. Las estructuras se jerarquizan en términos de confiabilidad (C-score y TM-score) y desviación de las coordenadas atómicas (RMSD) respecto a la estructura de referencia, lo que permite seleccionar el mejor modelo (Yang y Zhang, 2015).

Una vez seleccionado el modelo con C-score más alto y RMSD más bajo, este se refinó en el servidor GalaxyRefine. Este programa se basa en una metodología de optimización global y local para la optimización de modelos tridimensionales de proteínas. Lo anterior se logra ajustando las posiciones de los átomos y las interacciones entre ellos para mejorar la coherencia y la calidad de la estructura (Heo et al., 2013).

Luego, la calidad del modelo 3D refinado se evaluó con ProSA-web y se validó la estructura terciaria en el servidor SAVESv6 con las herramientas PROCHECK (PROtein CHECKing) y ERRAT (Empirical R-factor). La primera permite analizar la gráfica de Ramachandran del modelo; mientras que la segunda indica la calidad de la estructura con base en la compatibilidad de las conformaciones atómicas del modelo con la estructura de una

proteína ya resuelta (Wiederstein y Sippl, 2007). Además, se utilizó el programa CHIMERA1.13 de la Universidad de California en San Francisco para una mejor visualización de la estructura, puesto que ofrece una interfaz interactiva para analizar estructuras moleculares tridimensionales

IV.6 Simulaciones inmunológicas

Con el fin de evaluar la respuesta inmune inducida por la CVLm, se simuló su interacción con TLR y se predijo su inmunogenicidad *in silico*.

IV.6.1 Simulación de acoplamiento de CVLm con receptores de la inmunidad innata

El acoplamiento molecular con TLR-2, TLR-4 y TLR-9 se realizó en el servidor web ClusPro 2.0, donde se evaluaron las mejores soluciones basadas en la puntuación vinculante. En el programa se introdujo el código de acceso en PDB de los receptores (TLR-2: 2Z7X; TLR-4: 4G8A; TLR-9: 3WPF) y para el ligando (CVLm) se envió el archivo .pdb de la estructura terciaria refinada. La simulación de las interacciones se visualizó en Mol* 3D Viewer de RSCB PDBP, donde se analizaron los sitios de unión ligando-receptor.

IV.6.2 Simulación de inducción de respuesta inmune adaptativa

La inmunogenicidad de la vacuna se simuló en el servidor C-ImmSim, el cual utiliza un modelo fisiológico para simular la interacción de varias células del sistema inmune con antígenos proteicos, por lo que permite analizar el posible desarrollo de la RI en humanos. En el programa cada paso de simulación virtual equivale a 8h reales. Con esto en cuenta se utilizó un esquema de inmunización planteado por Kashyap et al (2017) donde se programaron tres inyecciones en los pasos de simulación 1, 36 y 72, correspondientes a los días 0, 12 y 24. Asimismo, la respuesta inmunológica se evaluó frente a los alelos HLA-A02:01, HLA-A68:02, HLA-B35:01, HLA-B39:01, HLA-DRB115:01 y HLA-DRB116:01 durante 100 pasos de simulación total (35 días). El resto de los parámetros se mantuvo en sus valores predeterminados.

IV.7 Optimización de codones y clonaje *in silico* de CVLm

Se realizó la traducción inversa y la optimización de los codones de la secuencia de la vacuna utilizando el servidor Jcat. Para ello se seleccionó *Escherichia coli* K12 como cepa de expresión evitando los sitios de corte de enzimas de restricción. Con estos resultados se realizó un análisis del índice de adaptación de codones y del contenido de GC de la secuencia de ADN, considerando que se encontrasen en el rango de 0.8-1.0, y 30-70 %, respectivamente (Hajighahramani et al., 2017).

Por último, se clonó el gen que codifica para CVLm (vac) en la región MSC del vector pVAX1[+], mediante la incorporación de sitios de restricción para las enzimas BamHI y XbaI. Lo anterior se realizó mediante el programa SnapGene.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Análisis del proteoma de *L. mexicana*

Mediante la búsqueda en la base de datos Refseq, se encontró que existen dos genomas de referencia de *L. mexicana*, por lo que se seleccionó el correspondiente a la cepa tipo (MHOM/GT/2001/U1103, número de referencia GCF_000234665.1), secuenciado en 2011 en el Wellcome Trust Sanger Institute y procedente de una lesión óptica de un paciente de 30 años en Guatemala.

El genoma es de 32.1 Mb organizadas en 8249 genes, de los cuales 8133 (equivalentes al 98.6% del genoma) corresponden a genes codificantes de proteínas y el resto a pseudogenes (Figura 4A). El valor scaffold N50 referido para este genoma es de 1 Mb, lo cual es un valor aceptable del parámetro e indica que la secuenciación tiene calidad aceptable (Rogers et al., 2011). Entre los genes con mayor expresión se encuentra el gen que codifica para leishmanolisina. Asimismo, los genes codificantes para amastina, para una proteína hipotética conservada y cisteína peptidasa, se encuentran entre los genes con mayor número de copias en la especie, lo cual reafirma la relevancia de las proteínas para las cuales codifican como posibles antígenos a incluir en una vacuna contra leishmaniasis.

V.2 Antígenos de interés vacunal predichos y seleccionados *in silico*

El análisis bioinformático del proteoma de *L. mexicana* U1103 se inició con la selección de las proteínas antigénicas en el servidor Vaxijen 2.0, el cual predice la antigenicidad de proteínas y péptidos con una precisión mayor al 78% (Singh et al., 2020b). A través de la plataforma se predijo un total de 5651 secuencias antigénicas con un umbral ≥ 0.6 , lo cual corresponde al 69.5% de las secuencias analizadas (Figura 4B). De los antígenos, con un máximo de una hélice transmembrana (Figura 4C), sólo 2280 no fueron homólogas al proteoma humano ni alergénicas (Figura 4D,E), por lo cual se consideraron para la predicción de la localización subcelular.

Mediante el análisis conjunto de los resultados obtenidos en SecretomeP 2.0, DeepLoc y CELLO, se predijo un conjunto de 115 proteínas con péptidos de secreción de vía clásica y no clásica, así como 226 proteínas con posible localización en la membrana citoplasmática del parásito (Figura 4F,G). Los sistemas de clasificación de los programas utilizan la composición de aminoácidos, la composición de di-péptido y la composición de la secuencia basada en las propiedades físico-químicas de aminoácidos para realizar sus predicciones (Thumuluri et al., 2022). De esta manera, se seleccionaron las proteínas membranales ubicadas en membrana plasmática o en la región extracelular que coincidían en los tres programas; a partir de las cuales se construyó una base de datos de 341 secuencias. Las proteínas excretadas-secretadas de *Leishmania* son importantes factores de virulencia y están implicadas en las primeras interacciones hospedero-parásito, el establecimiento de la infección y la regulación de la RI. Su papel en la modulación y evasión de las respuestas inmunitarias se ha revisado ampliamente (Wanderley et al, 2018).

Tras predecir la presencia de secuencias de anclaje a GPI en los antígenos, se obtuvo que 39 de las proteínas analizadas presentan motivos de anclaje con un 95% de confianza (Figura 4H). Además, de las 341 proteínas en la base de datos, 55 tenían un índice de inestabilidad menor a 40 y un peso molecular <110 kDa (Figura 4I) (Apéndice 2). Dado que mostraron valores adecuados de estabilidad, alergenicidad y peso molecular *in silico*, se consideraron posibles antígenos vacunales y se seleccionaron para la predicción epitópica.

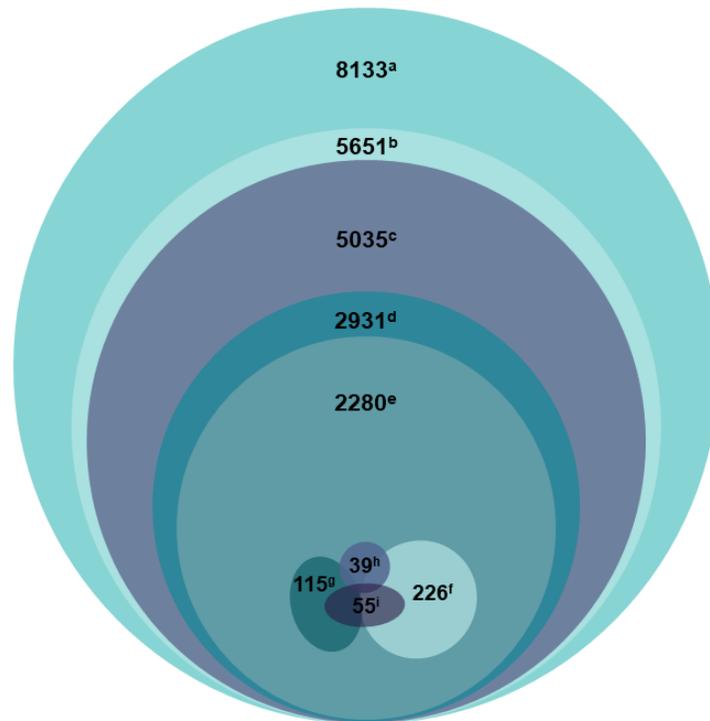


Figura 4. Antígenos vacunales predichos a partir del genoma de *L. mexicana* U1103. **(A)** proteínas totales después de eliminar duplicados. **(B)** Proteínas antigénicas. **(C)** Antígenos con una o ninguna hélice transmembrana. **(D)** Proteínas no homólogas al proteoma humano. **(E)** Proteínas no alergénicas. **(F)** Proteínas de membrana plasmática. **(G)** Proteínas secretadas o extracelulares. **(H)** Proteínas que contienen un anclaje de GPI. **(I)** Secuencias estables con peso molecular < 110 kDa.

Hasta la fecha se han identificado numerosos candidatos a vacunas para la LC en programas de investigación de vacunas a nivel global y, varios de los antígenos utilizados en los candidatos más avanzados son parte del secretoma o de la superficie de *Leishmania*. Estos candidatos abarcan, por ejemplo, la NH36, la LmMBA, varias cisteína-proteinasas y glicoproteínas citadas en los antecedentes de este trabajo. Algunas de estas proteínas se han encontrado gracias a la aplicación exitosa de herramientas computacionales, demostrando que la VR es una alternativa prometedora para descubrir nuevos antígenos o enmarcar otros ya descritos.

Los antígenos predichos con la metodología diseñada en este trabajo consisten principalmente en proteínas hipotéticas de superficie y secreción, de las cuales aproximadamente el 70% están conservadas en el complejo de especies *L. mexicana* (Apéndice 2). De manera importante, se predijeron adenilato ciclasas, fructofuranosidasas, serina-peptidasas y endopeptidasas, nucleasas y una proteína similar a GP46. Según nuestro conocimiento, estos antígenos no se han reportado en otros estudios bioinformáticos de *L. mexicana*, por lo que consideramos ofrecen una nueva alternativa para la construcción de vacunas contra el parásito.

V.3 Selección de epítomos reconocidos por alelos de HLA y células B

Los genes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA en humanos) presentan polimorfismo elevado, lo que resulta en más de 8000 variantes alélicas de antígenos leucocitarios humanos. El análisis de epítomos para este número de alelos se dificulta incluso cuando se utiliza una base de datos robusta como lo es IEDB o NetMHCpan (Hamrouni et al., 2020). Por tanto, se seleccionaron los alelos más frecuentes en México.

Utilizando los 55 potenciales antígenos vacunales, se predijeron un total de 20,371 péptidos antigénicos que se unen al menos a uno de los siete alelos de HLA-I analizados. Tras eliminar las secuencias redundantes, 287 epítomos fueron identificados como SB y de estos 10 fueron promiscuos para más de tres alelos, entendiéndose la promiscuidad como la capacidad de un péptido para ser reconocido por varias moléculas de HLA diferentes. Lo anterior incide notablemente en la cobertura poblacional y el desarrollo de la RI, por lo que es fundamental en la inmunogenicidad de una vacuna (Perez et al., 2019).

Finalmente, se encontró que de los 10 epítomos promiscuos seis cumplieron con la condición de antigénicos (propensión de antigenicidad > 0.5) y de estos, cuatro presentaron un índice de antigenicidad positivo, por lo que se seleccionaron como péptidos con potencial para inducir respuestas de CTL (Tabla 3).

Tabla 3. Epítomos reconocidos por HLA-I. Se señalan en negrita los epítomos seleccionados para incluir en la vacuna.

Secuencia peptídica	Proteína de origen	Pos.	Antigenicidad	Inmunogenicidad	Reconocimiento
AQAPRV ^{TAL}	XP003877983.1	410	0.6072	0.14642	HLA-A*02:01 HLA-B*15:01 HLA-B*39:01
FLIDFIPAL	XP003874980.1	953	1.1105	0.3183	HLA-A*02:01 HLA-A*68:02 HLA-B*39:01
FLYPPLHKL	XP003875870.1	311	0.2126	-0.1323	HLA-A*02:01 HLA-A*68:02 HLA-B*39:01
GQVDWLVAL	XP003877530.1	112	0.4539	0.29868	HLA-A*02:01 HLA-B*39:01 HLA-B*15:01
HASEVMSSL	XP003877867.1	972	0.53338	-0.31433	HLA-A*68:02 HLA-B*35:01 HLA-B*39:01
LSSPPSYTF	XP003872125.1	32	0.5081	-0.21183	HLA-B*35:01 HLA-A*24:02 HLA-B*15:01
MIAPFSLAL	XP003877530.1	1	0.8454	0.2669	HLA-A*68:02 HLA-A*02:01 HLA-B*35:01
MMNSTAHTF	XP003878806.1	51	0.488	-0.04396	HLA-B*15:01 HLA-B*35:01 HLA-A*24:02
TAFSVSETL	XP003874117.1	707	0.7364	0.13682	HLA-A*68:02 HLA-B*35:01 HLA-B*39:01
TLYQHGISL	XP003875871.1	451	0.2759	-0.387	HLA-A*02:01 HLA-B*39:01 HLA-B*15:01

En el caso de las moléculas de HLA tipo II, se predijeron 10,282 epítomos redundantes para los alelos seleccionados. Entre estos, se detectaron 126 péptidos con unión fuerte a DRB1*04:07. Dicho alelo ha sido reportado con anterioridad en personas con más susceptibilidad a padecer LC, por lo que los epítomos con unión preferencial a DRB1*04:07 se eliminaron del análisis. Se encontraron 276 secuencias únicas con unión fuerte a al menos un alelo de HLA-II, sin embargo, solo 11 se predijeron como inductores fuertes de IFN- γ a partir

de los cuales se seleccionaron los epítomos más antigénicos y promiscuos para al menos dos alelos HLA-II (Tabla 4).

Tabla 4. Epítomos con propensión a inducir respuestas de HTL y secreción de IFN- γ . El núcleo de unión a HLA-II de cada epítomo se señala en negrita.

Secuencia peptídica	Proteína de origen	Pos.	Antigenicidad	Índice de IFN	Reconocimiento
RIEYVSLY SNSLTGT	XP003877666.1	136	1.4334	1	HLA-DRB1*07:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02 HLA-DQA1*05:01/ DQB1*02:01
NADLSQY TNVSVRMP	XP003871798.1	193	0.8581	0.93	HLA-DRB1*07:01 HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02
RSAMQVY QNGAVPSR	XP003877089.1	623	0.8578	0.10	HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*16:02
GDEVSATA AAAAATA	XP003873721.1	276	0.7308	0.86	HLA-DRB1*07:01 HLA-DRB1*08:02 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02 HLA-DQA1*14:01/ DQB1*03:01 HLA-DQA1*05:01/ DQB1*02:01 HLA-DQA1*15:05/ DQB1*03:01

En la predicción de epítomos de células B, BepiPred 3.0 predijo 730 epítomos, mientras que se encontraron 1,028 péptidos en ABCpred. De estos, 90 epítomos eran redundantes y solo 66 mostraron un puntaje de antigenicidad superior a 0.6. Dado que se seleccionaron cuatro epítomos para HTL y CTL, se decidió limitar la selección de epítomos B al mismo número. De esta manera, se eligieron los cuatro epítomos con mayor antigenicidad y mayor puntaje en ABCpred (Tabla 5).

Tabla 5. Epítomos más antigénicos reconocidos por receptores de células B.

Secuencia peptídica	Proteína de origen	Pos.	Antigenicidad	Índice de unión a BCR
TAPATAYTHERCGSND	XP003878412.1	152	0.8579	0.94
TGTNGTSGGSVKPREP	XP003878540.1	13	1.7290	0.93
AGAGSSGPTSASCADP	XP003878438.1	84	1.9480	0.92
GGTYGGGQGEDGRRTS	XP003875871.1	667	2.4050	0.94

El análisis del origen de los epítomos seleccionados permite comprobar que tres cuartas partes de los mismos provienen de proteínas hipotéticas cuya función específica aún no se ha determinado mediante experimentos o estudios *in silico*. Aunque la relevancia biológica e inmunológica de estas proteínas sea desconocida, la predicción de epítomos inmunogénicos en su secuencia implica que pudieran tener un impacto significativo en las interacciones parásito-hospedero de *L. mexicana*.

Por otra parte, entre las proteínas estimulantes de respuestas CTL se encontró a la proteína similar a la D-alanil-glicil endopeptidasa. Este tipo de enzimas están involucradas en la degradación de las paredes celulares bacterianas, sin embargo su función exacta en *L. mexicana* no se conoce del todo. Dentro del género *Leishmania*, las endopeptidasas tienen gran relevancia metabólica por su papel en la remodelación de la superficie celular, resistencia a factores estresantes y como factor de virulencia (Bhat y Qureshi, 2021).

Otro inductor de CTL fue la proteína putativa con repeticiones FG-GAP. Los motivos FG-GAP se encuentran normalmente en integrinas y están involucradas en las interacciones célula-célula, reconocimientos de patógenos y factores de virulencia desencadenantes de RI innata (Blum et al., 2021). Similar a la endopeptidasa, esta proteína no está caracterizada experimentalmente en *L. mexicana*, sin embargo, un homólogo en *L. donovani* ha sido propuesto como candidato a vacuna mediante VR (Khatoon et al., 2017).

Entre los inductores de respuesta HTL se encontró a la proteína de superficie similar a GP46. Esta es una proteína de membrana citoplasmática que comparte características o función comunes a la proteína gp46, la cual es uno de los principales factores de virulencia de *Leishmania* por su papel en la adherencia y entrada en las DC (McMahon-Pratt et al., 1993). Se predijo además que la beta-fructofuranosidasa putativa puede desencadenar secreción de IFN-

γ , lo que deriva en la estimulación de la respuesta Th1. Esta enzima de tipo invertasa ha sido detectada en todas las especies de *Leishmania*, específicamente en los promastigotes. La β -fructofuranosidasa es relevante en el metabolismo de carbohidratos, e interviene en procesos de sobrevivencia, multiplicación, desarrollo y transmisión del parásito en el vector (Lyda et al., 2015).

V.4 Diseño y caracterización de las construcciones de vacuna multi-epitópica

El diseño de la proteína quimérica es un paso crítico en el desarrollo de vacunas multi-epítomos. En general, las plataformas de vacunas incluyen estructuras adicionales a los epítomos, entre los más comunes están los adyuvantes, estructuras estabilizadoras y enlazadores (Slathia y Sharma, 2020). Con esto en cuenta se diseñaron cuatro construcciones de vacuna, nombradas CV1-4, compuestas por 12 epítomos (4 para HTL, 4 para CTL, 4 para células B), un adyuvante, enlazadores y una etiqueta de histidina. La CV1 y CV3 cuentan además con una estructura de trímero unido a un pentámero.

En específico, se seleccionó un agonista de TLR, el péptido PADRE como adyuvante. El mismo se ha incorporado en vacunas nanoliposomales y en péptidos de varios tamaños contra el cáncer y enfermedades infecciosas. Está diseñado para mejorar la potencia de los antígenos al promover respuestas de células T y mejorar la respuesta inmunitaria a los epítomos coadministrados; también se sabe que se une a una amplia gama de moléculas HLA de clase II, estimulando así las células Th1 (Alexander et al., 2000). Ambos efectos son altamente deseables para inducir protección frente a *Leishmania*.

Por otro lado, los enlazadores desempeñan un papel importante en la inhibición de la generación de epítomos diferentes y no deseados. El enlazador rígido EAAAK se ha utilizado ampliamente en el diseño de vacunas multi-epítomo para separar adyuvantes y epítomos en la construcción. Por otro lado, los enlazadores flexibles (AAY, GGGS, GPGPG, KK, por ejemplo) conectan los dominios de la proteína y permiten su movimiento e interacción, al tiempo que evitan interferencias con el plegamiento y el funcionamiento de los dominios (Bibi et al., 2021; Yang et al., 2015).

Asimismo, los motivos triméricos y pentaméricos que se incluyeron en dos de las variantes han sido previamente descritos por su aporte a la estabilidad de proteínas quiméricas de tamaño pequeño (Singh et al, 2020a). Por otro lado, la etiqueta de seis histidinas (His-tag, del inglés) es un péptido ampliamente utilizado en biología molecular y biotecnología debido a su simplicidad y eficacia en la purificación y el análisis de proteínas (Mishra, 2020).

V.4.1 Características fisicoquímicas, antigenicidad y alergenicidad de las CV.

La caracterización fisicoquímica es uno de los aspectos fundamentales del diseño y la investigación de candidatos vacunales. Las características físico-químicas, antigénicas y alergénicas de las variantes de vacuna se muestran en la Tabla 6. Todas las construcciones de vacuna se predijeron como no alergénicas y antigénicas, sin embargo la antigenicidad más alta se observó para CV4 y CV2.

De acuerdo a los cálculos de ProtParam, el peso molecular teórico de las CV osciló entre 23 y 36 kDa, siendo CV2 la proteína más pequeña y menos pesada. En todos los casos, el punto isoeléctrico teórico resultó por encima de 9, lo que sugiere que las CV son proteínas altamente cargadas. De acuerdo al índice de inestabilidad (ii), CV2 fue la proteína más estable dado que el valor del parámetro se encuentra por debajo del límite (40 unidades) y es el más bajo entre todas las construcciones. El índice de inestabilidad para CV3 se estimó en 41.18, lo que indica que la construcción es inestable dado que un índice < 40 unidades indica inestabilidad *in vitro* (Gasteiger et al., 2005). Debido a esto, la CV3 no se consideró en el resto de los análisis.

Se predijo una vida media similar para todas las construcciones, sin embargo, CV1 y CV2 mostraron mejores valores de termoestabilidad (mayor índice alifático). Por otro lado, se encontró que todas las construcciones son hidrofílicas (índice de hidropaticidad negativo). Lo anterior sugiere que la presencia de regiones hidrofílicas en las proteínas pueden interactuar apropiadamente con los receptores inmunes (Liljeroos et al., 2015). Por último, el valor de solubilidad más alto se encontró para CV2 según la herramienta Protein-Sol, donde se considera que las proteínas con puntaje mayor que 0.5 son solubles en condiciones fisiológicas (Hebditch et al., 2017).

Tabla 6. Características fisicoquímicas de las construcciones de vacuna multi-epitópica contra *L. mexicana*.

Característica	CV1	CV2	CV3	CV4
Número de aminoácidos	331	230	326	221
Antigenicidad	0.58	0.71	0.62	0.78
Alergenicidad	-	-	-	-
Peso molecular (kDa)	35.54	23.14	35.54	23.15
Punto isoelectrico teórico	9.58	9.76	9.48	9.64
Número de residuos con carga negativa (Asp + Glu)	32	13	32	13
Número de residuos con carga positiva (Arg + Lys)	41	23	41	23
Índice de inestabilidad	36.58	25.01	41.18	31.12
Vida media estimada <i>in vitro</i>	1h	1h	1h	1h
Índice alifático	59.15	55.58	63.13	51.13
Hidropaticidad (índice GRAVY)	-0.62	-0.38	-0.56	-0.45
Solubilidad	0.35	0.52	0.39	0.39

La estabilidad y solubilidad de las proteínas, de conjunto con la evaluación del resto de los parámetros fisicoquímicos, permitieron seleccionar la CV2 como mejor candidato vacunal, la cual se renombró como CVLm (Figura 5). El tamaño pequeño de la construcción es recomendable para facilitar la interacción de la vacuna con sus receptores inmunitarios específicos. Además, su peso molecular por debajo de 100 kDa puede contribuir a una fácil purificación y síntesis de la proteína, así como a su administración con nanopartículas (Liljeroos et al., 2015).

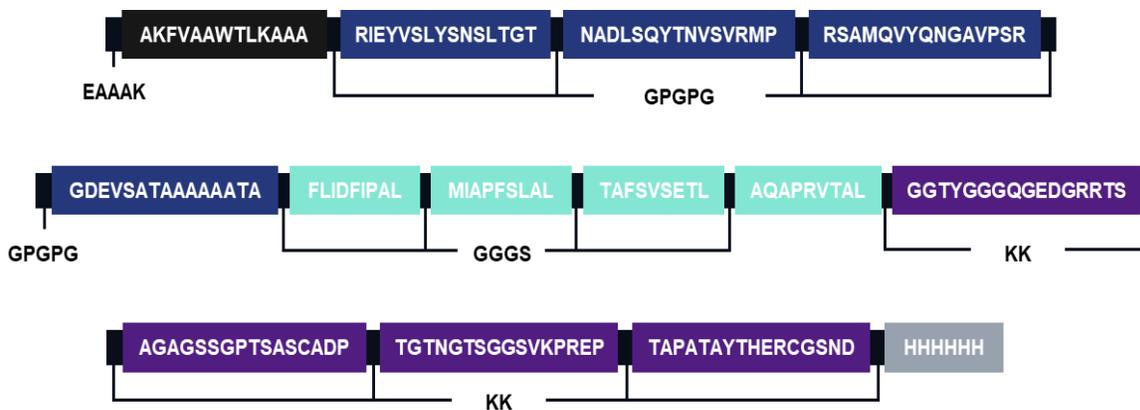


Figura 5. Secuencia de la construcción de vacuna contra *L. mexicana* (CVLm). Se representa el adyuvante PADRE (negro) seguido por los epítotos HTL (azul oscuro) conectados mediante enlaces GPGPG, los epítotos CTL (cian) a través de GGGs y los epítotos de células B (BCR, morado) enlazados con KK. En el extremo C-terminal una etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal (gris) se añadió mediante un enlazador KK.

Los resultados indican que CVLm podría interactuar bien con las moléculas de agua y probablemente tenga un fácil acceso a las células inmunitarias del hospedero. Además, la vacuna contiene una notable presencia de serina (24 residuos), treonina (19 residuos), lisina (15 residuos) y arginina (10 residuos) que contribuyen a la accesibilidad del solvente (Naz et al., 2019). Por otro lado, CVLm tiene atributos que indican la estabilidad estructural de la proteína, incluida la solubilidad teórica y la termoestabilidad (Hebditch et al., 2017).

V.5 Estructura secundaria y modelo tridimensional de CVLm

De acuerdo a los resultados obtenidos en los programas SOPMA y PSIPRED (Figura 6), la estructura secundaria de CVLm consiste en un 58.26 % de enrollamiento aleatorio, un 14.78 % de hélice alfa, un 18.26 % de hebra extendida y un 8.70 % de giro beta. Estas predicciones revelan que la estructura exhibe un alto porcentaje de hebras extendidas y enrollamiento aleatorio, características de moléculas descritas por su alto potencial para inducir respuestas de células T (Perez et al., 2019).

Los estudios de modelado en I-TASSER reportaron cinco modelos, de los cuales el modelo 1 (C-score = -2.82, TM-Score = 0.39 ± 0.13 , RMSD = 12.2 ± 4.4 Å, fue elegido como el mejor modelo debido a que presentó la mejor correlación entre el C-score y el TM-score. Después del refinamiento de la proteína utilizando GalaxyRefine la estructura con mejores resultados fue el modelo 4 (RSMD = 0.438). El RMSD es un parámetro importante ya que ofrece información sobre la estructura de la proteína en cuanto a su estructura de cadena principal junto con las variaciones estructurales durante las simulaciones del modelo (Heo et al., 2013). El RMSD más bajo en comparación con el del modelo original de I-TASSER sugiere que la proteína puede tener una conformación estable sin autodegradación. Esta es una propiedad importante para el reconocimiento y procesamiento de antígenos (Negahdaripour et al., 2018).

El modelo 4 se visualizó en CHIMERA1.13 (Figura 7A), donde se observó una molécula abierta y flexible cuyos dominios coinciden con la predicción de la estructura secundaria. Para esta estructura, se calculó un valor z de -5.77 en ProSA-web (Figura 7B) y se obtuvo un puntaje de calidad ERRAT de 52.78 % en SAVES6.0, lo que indica que el modelo de estructura terciaria probablemente no contiene errores (Colovos Yeates, 1993). El valor Z indica que la proteína se encuentra dentro del rango típico observado en estructuras de proteínas experimentales de tamaños comparables.

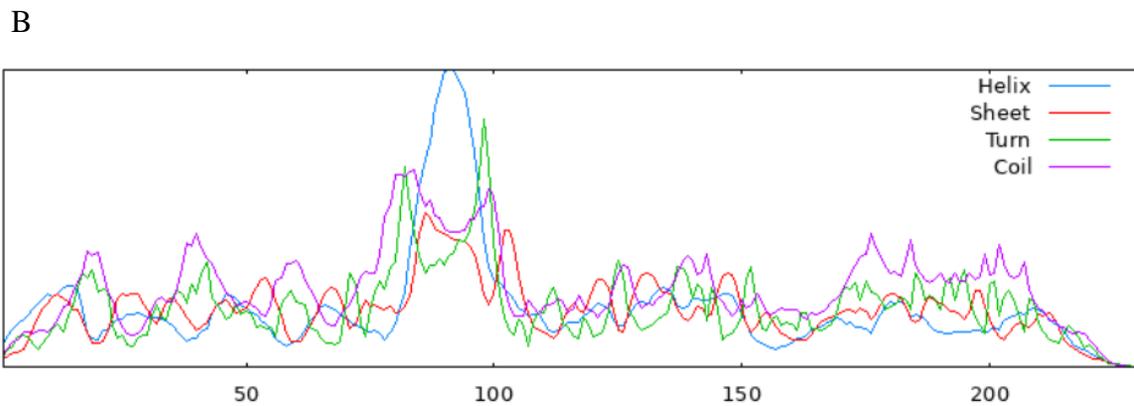
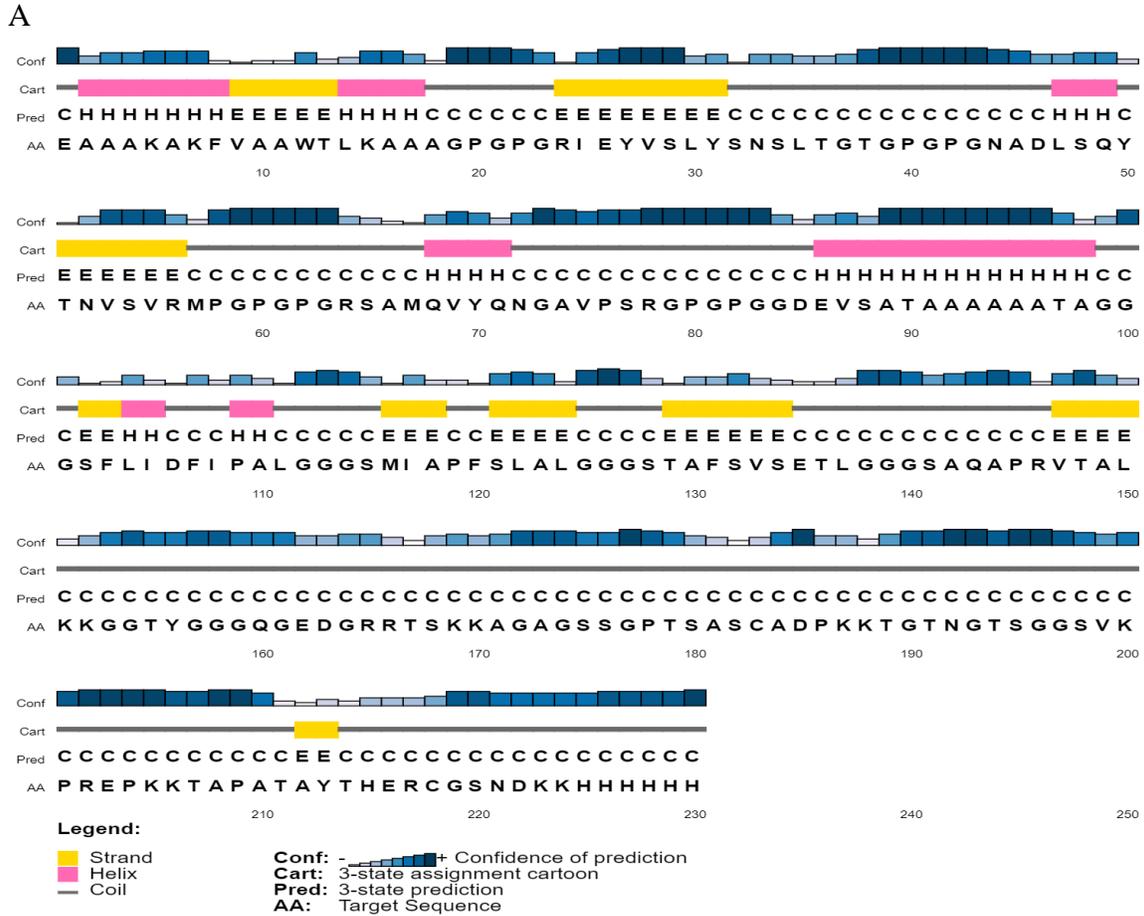


Figura 6. Predicción de la estructura secundaria de CVLm utilizando (A) PSIPRED y (B) SOPMA. (A) Esquema de probabilidad de conformaciones de cada residuo de la proteína, el nivel de confianza se muestra en escala de azules. Las estructuras de enrollamiento aleatorio (gris) predominan sobre las hebras extendidas y giros- β (amarillo), así como sobre las α -hélices (rosa). (B) Gráfico de configuración de los aminoácidos en la secuencia. El pico más alto en cada posición indica la estructura secundaria más probable: enrollamiento aleatorio (morado), hebra extendida (rojo), giro- β (verde), α -hélice (azul).

El mapa de Ramachandran de PROCHECK mostró que un 82.1 % de los residuos se encontraban en regiones muy favorecidas, un 15.5 % en regiones permitidas y un 2.4 % estaban en regiones no permitidas (Figura 7C).

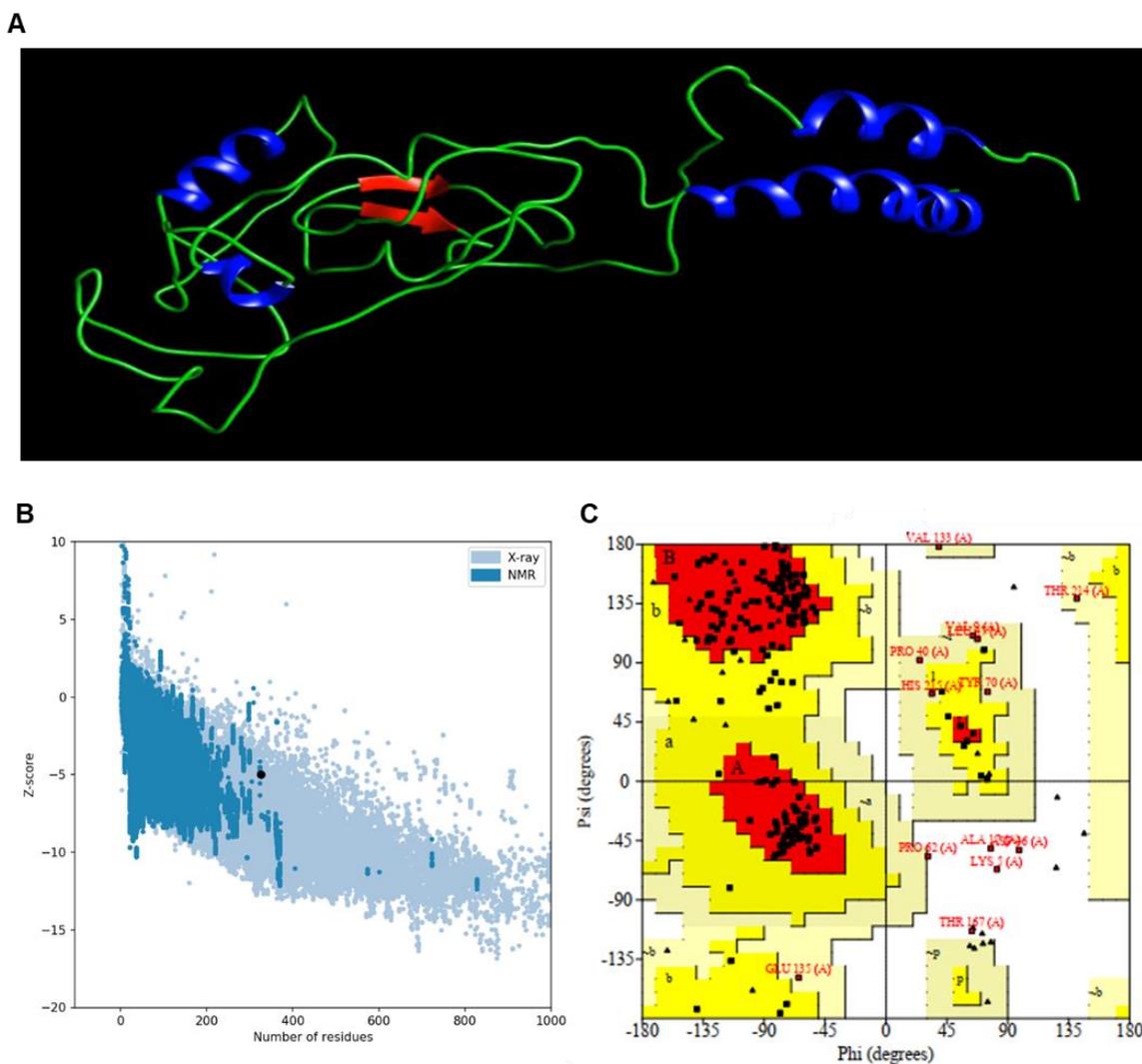


Figura 7. Modelo tridimensional de la construcción de la vacuna refinada y evaluación de su calidad. **(A)** En el modelo 3D de CVLm se representan las hélices alfa en azul, enrollamientos aleatorios y giros beta en verde, y hebras extendidas en rojo. **(B)** Mapa de valor Z de ProSAweb. El punto negro indica el valor Z de la vacuna, dentro del rango de proteínas con estructura resuelta experimentalmente. **(C)** Gráfica de Ramachandran de CVLm. Los residuos en las regiones más favorecidas se indican con A, B, I; en regiones permitidas adicionales se indican con a, b, l, p, ~a, ~b, ~l, ~p.

De acuerdo al programa, un modelo de buena calidad debe contar con más del 90% de los aminoácidos en regiones permitidas y favorecidas. Para CVLm se obtuvo 97.6% de los residuos en dichas regiones, lo que avala la calidad del mismo y respalda que la conformación modelada sea una de las más probables que adopte la molécula. No obstante, es importante señalar que los cuatro residuos en regiones no permitidas pueden inducir restricciones estéricas en la proteína.

La conformación de estos residuos podría explicarse porque la proteína modelada es una quimera, y los modelos tridimensionales obtenidos con I-TASSER son generados por algoritmos de homología (Lee et al, 2022). Esto significa que podrían introducirse sesgos en la estructura durante el proceso de modelado, lo que influye en la calidad del modelo tridimensional aunque el modelo se someta a refinamientos adicionales. Esta información es valiosa para realizar cambios en la secuencia de la proteína con el fin de mejorar su estabilidad conformacional (Albano et al., 2018).

V.6 Simulaciones de inducción de respuesta inmune

El acoplamiento entre un epítipo y su receptor inmune específico es una característica general de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas interacciones se pueden examinar con base en simulaciones dinámicas, las cuales permiten estudiar la accesibilidad de la estructura al receptor, la orientación del epítipo durante el acoplamiento y la estabilidad de la unión ligando-receptor. Con esta estrategia se pueden estudiar uniones a disímiles receptores, entre ellos HLA, TLR y anticuerpos.

V.6.1 Acoplamiento de la CVLm con moléculas del sistema inmune innato

El sistema inmune innato (SII) es una de las primeras barreras frente a patógenos y alérgenos. El mismo proporciona una respuesta rápida y generalizada a las amenazas químico-biológicas y es esencial en el control de las primeras etapas de una infección. El SII está compuesto por barreras físicas y químicas, células y proteínas que actúan de conjunto en la protección de la integridad inmunitaria de un organismo (Germic et al., 2019).

Los receptores de tipo Toll (TLR, del inglés), son unas de las proteínas más importantes del SII por su papel en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como en la activación y regulación de la RI a los mismos. Específicamente, los TLR-2, TLR-4 y TLR-9 han sido descritos como mediadores de la RI a infecciones por varias especies de *Leishmania* (Mukherjee et al., 2016). Por otra parte, se han diseñado estrategias *in silico* para simular la interacción de epítomos derivados de *L. major* con receptores del SII, lo que demuestra la utilidad de estas predicciones en el diseño computacional de vacunas (Bordbar et al., 2020; Rabienia et al., 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, se estudió el acoplamiento molecular de CVLm con dichos TLRs como parte de la evaluación inmunológica de la vacuna. La simulación en el servidor web ClusPro 2.0 reveló 10 modelos diferentes definidos por complejos de baja energía de las estructuras acopladas. Para el TLR-2, se encontró la energía de acoplamiento más baja (puntuación de energía ponderada). Por el contrario, el TLR-9 fue el receptor con los puntajes más altos.

Finalmente, el modelo con energía más baja para cada receptor se visualizó utilizando la herramienta Mol* 3D (Figura 8). La visualización interactiva reveló que varios epítomos de CVLm interactuaron con los residuos del sitio de unión de los TLR.

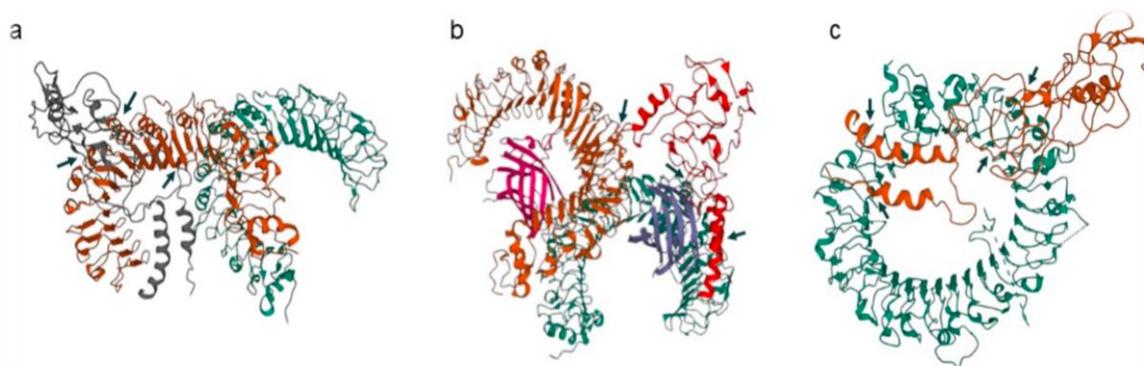


Figura 8. Mejores cuatro modelos de acoplamiento de CVLm con TLRs simulado en ClusPro2.0 y visualizado en Mol* 3D de PDB. Las flechas indican los sitios de interacción (A) CVLm (gris) y TLR-2 (dímero verde y naranja) (B) CVLm (rojo) y TLR-4 (dímero verde y naranja con barriles azul y rosa) (C) CVLm (naranja) y TLR-4 (verde).

V.6.2 Inducción de respuesta inmune humoral y celular

Dado que no todos los péptidos con alta afinidad de unión a TLR son reconocidos como epítomos de células T, es importante comprobar que los epítomos pueden interactuar efectivamente con las moléculas de HLA y TCR (Germic et al., 2019). Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios de inmunogenicidad en C-ImmSim.

Los estudios de simulación inmunitaria revelaron que los títulos de inmunoglobulinas (Ig) aumentaron significativamente después de la segunda vacunación en el día 12, con rápido agotamiento del antígeno simultáneamente (Figura 9A). Al mismo tiempo, se observó un aumento sostenido en la población de células B junto con un pico de células B de memoria en el día 14 (Figura 9B).

La respuesta de células T se activó con la primera vacunación, donde ni las subpoblaciones de HTL ni CTL mostraron altos niveles de células anérgicas o en reposo (Figuras 9C y 9D). La respuesta predominante de HTL fue del subtipo Th1, observada desde el día 4 y alcanzando su máximo en el día 26, mientras que se observaron niveles indetectables de respuesta Th2 y baja respuesta de Th0 en todo el estudio (Figura 9E).

Se observó una alta producción de IFN- γ e IL-2 y una producción de TGF- β moderada, alcanzando niveles máximos en el día 15 y disminuyendo gradualmente después. No se observó inducción de IL-4 ni TNF- α en la simulación. Curiosamente, se detectaron niveles equivalentes de IL-10 e IL-12 en el período de simulación (Figura 9F).

Las DC y los macrófagos (MA) mostraron niveles totales de recuento celular altos. La actividad de las DC se mantuvo constante, mientras que el recuento de MA presentadores de antígenos fluctuó con cada inyección de vacuna (Figuras 9G y 9H). Las células NK tendieron a aumentar y disminuir rápidamente después de cada inyección de vacuna (Figura 9I).

V.7 Clonación virtual en pVAX1[+]

La producción y purificación a gran escala de vacunas basadas en proteínas plantean desafíos adicionales en el diseño de una construcción de vacuna multi-epítome. Sin embargo, las

construcciones de vacuna diseñadas *in silico* pueden administrarse como vacunas de proteínas o como vacunas de ácido nucleico dentro de nanoestructuras (Srivastava et al., 2016).

El enfoque de vacuna de ADN/ARNm ha demostrado mejoras significativas que pueden ayudar a eliminar la necesidad de sistemas de expresión proteica complejos y pasos adicionales de purificación (Tejeda-Mansir et al., 2019). Por lo tanto, CVLm se optimizó y adaptó para clonación en pVAX1, usando la cepa K12 de *E. coli* para adecuar el péptido para la administración como vacuna de ácidos nucleicos.

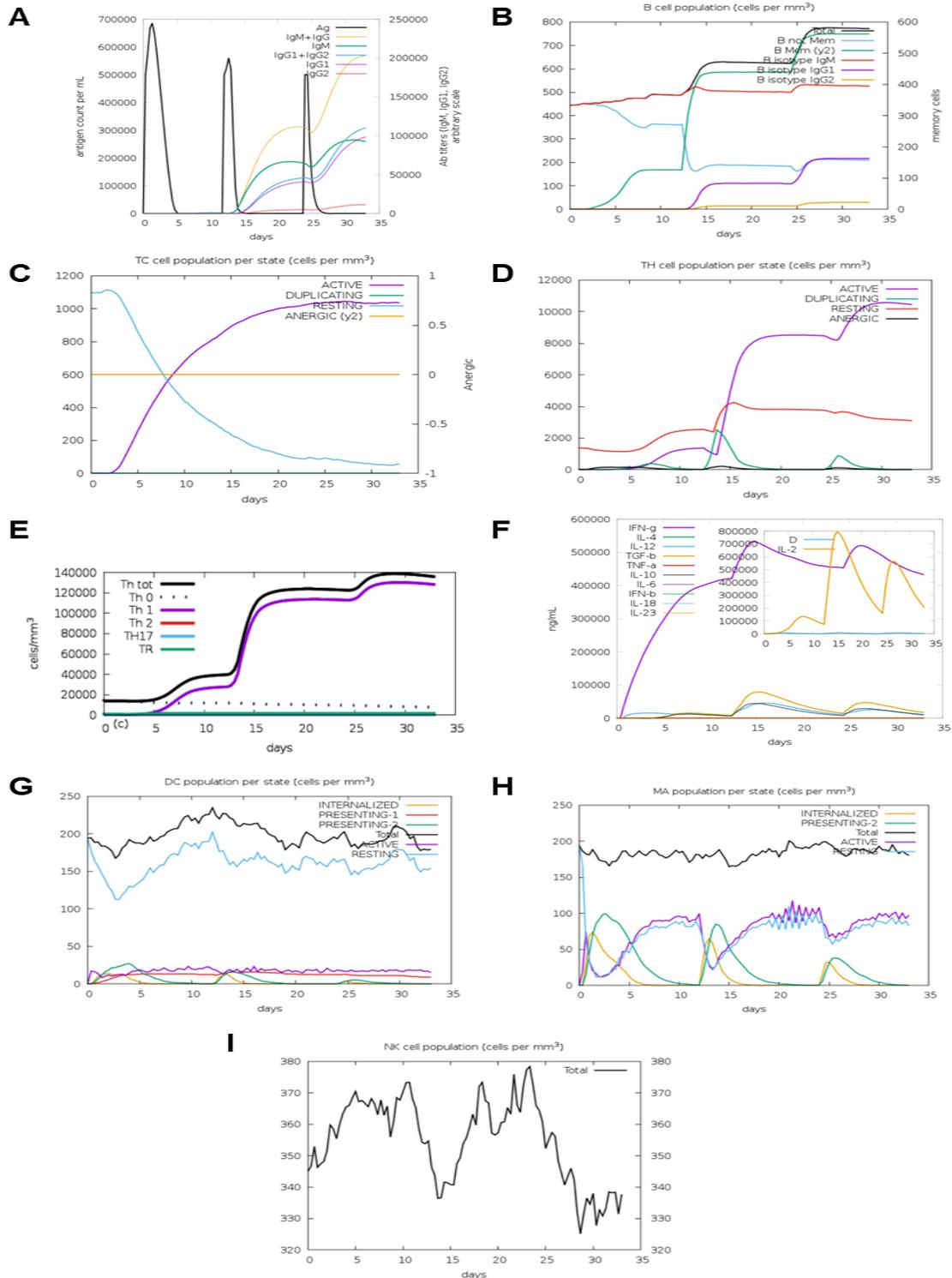


Figura 9. Respuesta inmune inducida por CVLm simulada en C-ImmSim con tiempo de inyección a 0, 12 y 24 días. **(A)** Niveles de inmunoglobulinas y antígeno. **(B)** Poblaciones de células B. **(C)** Poblaciones de CTL por estado. **(D)** Poblaciones de HTL por estado. **(E)** Niveles de de HTL por subtipo. **(F)** Niveles de citocinas. **(G)** Células dendríticas por estado. **(H)** Población de macrófagos por estado. **(I)** Población de células NK.

Primero se realizó la optimización de codones de la vacuna para lograr una clonación y expresión heteróloga exitosa en *E. coli* K12. Como resultado, en Jcat se predijo una adaptación completa y tasas de alta expresión en el vector (Figura 10A). El índice de adaptación de codones fue de 1.0 y el contenido de GC del 55.94 %. Ambos parámetros se encuentran dentro del rango deseado de 0.8-1.0 y 30-70 %, respectivamente (Negahdaripour et al., 2018).

CVLm se clonó virtualmente en el vector pVAX1[+], el cual ha sido utilizado anteriormente en el desarrollo de candidatos vacunales contra *L. mexicana* (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008; Burgos-Reyes et al., 2021). En SnapGene se obtuvo un mapa de restricción de la vacuna clonada en el plásmido (Figura 10B), en el que se posicionó el gen que codifica para CVLm (gen vac) dentro del sitio de clonación múltiple de pVAX1. Tras el análisis del mapa se constató que el gen se encuentra bien posicionado y que incluye sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y XbaI sin comprometer la integridad de la vacuna.

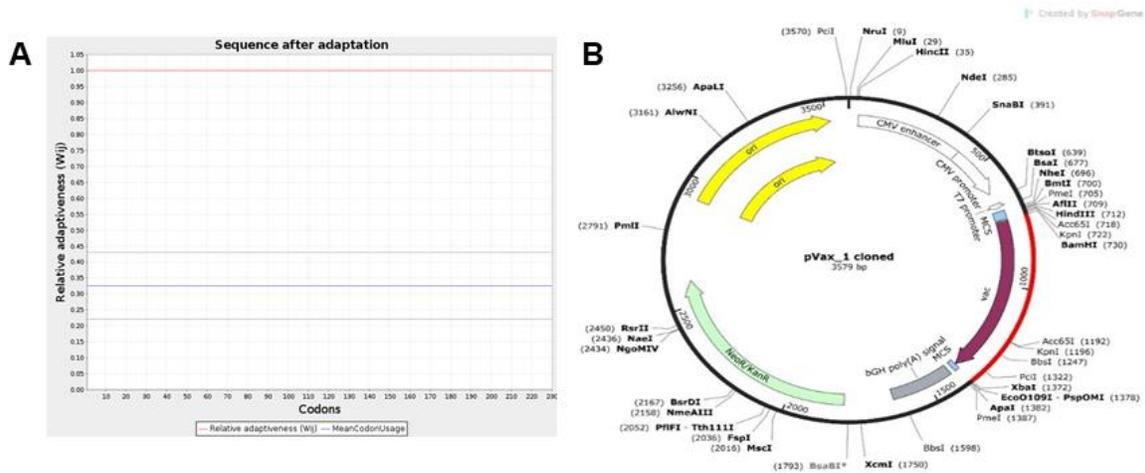


Figura 10. Optimización de codones y clonación in silico de CVLm. **(A)** Tasa de adaptación de codones del 100% y uso adecuado de codones en *E. coli* K12. **(B)** Secuencia de ADN optimizada (sección roja etiquetada como "vac") clonada en el sitio de clonación múltiple de pVAX1.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó una vacuna multi-epítomos dirigida a *L. mexicana*, integrando metodologías de inmunoinformática y vacunología reversa. Los antígenos y epítomos identificados con este diseño mostraron propiedades adecuadas para su inclusión en una vacuna protectora frente a la LC causada por *L. mexicana*. La proteína diseñada en esta investigación tiene una conformación espacial estable, y características fisico-químicas que respaldan su uso como nanovacuna de ADN.

La nanovacuna induce una respuesta inmune robusta *in silico* con la inducción de células Th1, citocinas y anticuerpos. El vector pVAX1[+] es adecuado para la clonación de la nanovacuna multi-epítomos en *E. coli* K12.

De conjunto, la evidencia aquí presentada muestra el camino para una nueva vacuna contra la leishmaniasis cutánea, sin embargo este candidato requiere validación experimental que avale su seguridad e inmunogenicidad *in vitro e in vivo*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda caracterizar experimentalmente los antígenos y epítomos predichos *in silico*.
2. Es recomendable realizar estudios de simulación dinámica, así como analizar y comparar el modelo de proteína obtenido de servidores que predicen estructuras utilizando algoritmos *ab initio* y refinamiento iterativo.
3. Se recomienda clonar el gen *VAC* en el plásmido pVAX1 para evaluar el uso de CVLm como vacuna de ADN o como proteína sintética en una nanopartícula.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. En *Actas Dermo-Sifiliograficas* (Vol. 112, Número 7, pp. 601–618). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- Aebischer, T., Wolfram, M., Patzer, S. I., Ilg, T., Wiese, M., & Overath, P. (2000). Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infection and immunity*, *68*(3), 1328–1336. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1328-1336.2000>
- Aguilar-Be, I., Da Silva Zardo, R., De Souza, E. P., Borja-Cabrera, G. P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., García-Miss, M. D. R., Palatnik De Sousa, C. B., & Dumonteil, E. (2005). Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and immunity*, *73*(2), 812–819. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.812-819.2005>
- Akbari, M., Oryan, A., & Hatam, G. (2021). Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Immunology letters*, *233*, 80–86. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2021.03.011>
- Akpunarlieva, S., Weidt, S., Lamasudin, D., Naula, C., Henderson, D., Barrett, M., Burgess, K., & Burchmore, R. (2017). Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in *Leishmania*. *Journal of Proteomics*, *155*, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.009>
- Akya, A., Farasat, A., Ghadiri, K., & Rostamian, M. (2019). Identification of HLA-I restricted epitopes in six vaccine candidates of *Leishmania tropica* using immunoinformatics and molecular dynamics simulation approaches. *Infection, Genetics and Evolution*, *75*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103953>
- Albano, J. M. R., Paula, E. de, & Pickholz, M. (2018). Molecular Dynamics Simulations to Study Drug Delivery Systems. En *Molecular Dynamics*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75748>
- Alexander, J., del Guercio, M.-F., Maewal, A., Qiao, L., Fikes, J., Chesnut, R. W., Paulson, J., Bundle, D. R., DeFrees, S., & Sette, A. (2000). Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses. *The Journal of Immunology*, *164*(3), 1625–1633. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.3.1625>
- Alves-Silva, M. V., Nico, D., De Luca, P. M., & Palatnik De-Sousa, C. B. (2019). The F1F3 Recombinant Chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection Against *Leishmania (V.) braziliensis* Infection in Mice. *Frontiers in immunology*, *10*(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00724>
- Askarizadeh, A., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., & Badiie, A. (2017). Liposomal adjuvant development for leishmaniasis vaccines. *Therapeutic advances in vaccines*, *5*(4–5), 85–101. <https://doi.org/10.1177/2051013617741578>

- Barquera, R., Hernández-Zaragoza, D. I., Bravo-Acevedo, A., Arrieta-Bolaños, E., Clayton, S., Acuña-Alonzo, V., Martínez-Álvarez, J. C., López-Gil, C., Adalid-Sáinz, C., Vega-Martínez, M. del R., Escobedo-Ruíz, A., Juárez-Cortés, E. D., Immel, A., Pacheco-Ubaldo, H., González-Medina, L., Lona-Sánchez, A., Lara-Riegos, J., Sánchez-Fernández, M. G. de J., Díaz-López, R., ... Granados, J. (2020). The immunogenetic diversity of the HLA system in Mexico correlates with underlying population genetic structure. *Human Immunology*, *81*(9), 461–474. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.06.008>
- Bhat, S. Y., & Qureshi, I. A. (2021). Structural and Functional Basis of Potent Inhibition of Leishmanial Leucine Aminopeptidase by Peptidomimetics. *ACS Omega*, *6*(29), 19076. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C02386>
- Bibi, S., Ullah, I., Zhu, B., Adnan, M., Liaqat, R., Kong, W. B., & Niu, S. (2021). In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80899-6>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA977>
- Bordbar, A., Bagheri, K. P., Ebrahimi, S., & Parvizi, P. (2020). Bioinformatics analyses of immunogenic T-cell epitopes of LeIF and PpSP15 proteins from *Leishmania major* and sand fly saliva used as model antigens for the design of a multi-epitope vaccine to control leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution*, *80*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104189>
- Burgos-Reyes, M. A., Baylón-Pacheco, L., Espíritu-Gordillo, P., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V., & Rosales-Encina, J. L. (2021). Effect of Prophylactic Vaccination with the Membrane-Bound Acid Phosphatase Gene of *Leishmania mexicana* in the Murine Model of Localized Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Immunology Research*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/6624246>
- Buxbaum, L. U. (2013). *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS neglected tropical diseases*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0002224>
- Castellano, L. R., Argiro, L., Dessein, H., Dessein, A., Da Silva, M. V., Correia, D., & Rodrigues, V. (2015). Potential Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of immunology research*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/152741>
- Cecílio, P., Oristian, J., Meneses, C., Serafim, T. D., Valenzuela, J. G., Cordeiro da Silva, A., & Oliveira, F. (2020). Engineering a vector-based pan-*Leishmania* vaccine for humans: proof of principle. *Scientific reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-75410-0>
- Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., & Chang, K. P. (1989). Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of biological chemistry*, *264*(13), 7483–7489. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2708373/>

- Chauhan, P., Shukla, D., Chattopadhyay, D., & Saha, B. (2017). Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in Leishmania infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 190(2), 167–186. <https://doi.org/10.1111/CEI.13014>
- Cianci, R., & Franza, L. (2022). Recent Advances in Vaccine Technology and Design. En *Vaccines* (Vol. 10, Número 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10040624>
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2(9), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560020916>
- Convit, J., Ulrich, M., Polegre, M. A., Avila, A., Rodríguez, N., Mazzedo, M. I., & Blanco, B. (2004). Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized Leishmania promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1), 57–62. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100010>
- Coutinho De Oliveira, B., Duthie, M. S., & Alves Pereira, V. R. (2020). Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 16(4), 919–930. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1678998>
- Daneshvar, H., Hagan, P., & Phillips, R. S. (2003). Leishmania mexicana H-line attenuated under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite immunology*, 25(11–12), 589–596. <https://doi.org/10.1111/J.0141-9838.2004.00671.X>
- Dar, M. J., McElroy, C. A., Khan, M. I., Satoskar, A. R., & Khan, G. M. (2020). Development and evaluation of novel miltefosine-polyphenol co-loaded second generation nano-transfersomes for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert opinion on drug delivery*, 17(1), 97–110. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1700227>
- de Freitas e Silva, R., & von Stebut, E. (2021). Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620144>
- de Vries, H. J. C., & Schallig, H. D. (2022). Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. En *American Journal of Clinical Dermatology* (Vol. 23, Número 6, pp. 823–840). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>
- de Vrij, N., Meysman, P., Gielis, S., Adriaensen, W., Laukens, K., & Cuypers, B. (2021). Hla-drb1 alleles associated with lower leishmaniasis susceptibility share common amino acid polymorphisms and epitope binding repertoires. *Vaccines*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines9030270>
- Dumonteil, E., Jesus, R. S. M., Javier, E. O., & Del Rosario, G. M. M. (2003). DNA vaccines induce partial protection against Leishmania mexicana. *Vaccine*, 21(17–18), 2161–2168. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00769-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00769-7)

- Eldin, C., Ranque, S., Gautret, P., & Parola, P. (2021). “Chiclero’s Ulcer” Due to *Leishmania mexicana* in Travelers Returning from Central America: A Case Report and Review of the Literature. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091112>
- Elmahallawy, E. K., & Alkhaldi, A. A. M. (2021). Insights into leishmania molecules and their potential contribution to the virulence of the parasite. *Veterinary Sciences*, 8(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/vetsci8020033>
- Elmahallawy, E. K., Alkhaldi, A. A. M., & Saleh, A. A. (2021). Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 139). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>
- Filho, A. A. P., Nascimento, A. A. de S., Saab, N. A. A., Fugiwara, R. T., D’Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Araújo, R. N., Sant’Anna, M. R. V., & Gontijo, N. F. (2021). Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. *Acta Tropica*, 224, 106152. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.106152>
- Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., & Santos-Gomes, G. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host’s Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2603730>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (s/f). Protein Analysis Tools on the ExPASy Server 571 571 From: The Proteomics Protocols Handbook Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Recuperado el 18 de junio de 2023, de <http://www.expasy.org/tools/>.
- Geourjon, C., & Deléage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 11(6), 681–684. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/11.6.681>
- Germanó, M. J., Mackern-Oberti, J. P., Vitório, J. G., Duarte, M. C., Pimenta, D. C., Sanchez, M. V., Bruna, F. A., Lozano, E. S., Fernandes, A. P., & Cargnelutti, D. E. (2022). Identification of Immunodominant Antigens From a First-Generation Vaccine Against Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.825007>
- Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death & Differentiation* 2019 26:4, 26(4), 715–727. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0297-6>
- González, C. R., Noriega, F. R., Huerta, S., Santiago, A., Vega, M., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., & Levine, M. M. (1998). Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine*, 16(9–10), 1043–1052. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00267-3)

- Graña, C., Ghosn, L., Evrenoglou, T., Jarde, A., Minozzi, S., Bergman, H., Buckley, B. S., Probyn, K., Villanueva, G., Henschke, N., Bonnet, H., Assi, R., Menon, S., Marti, M., Devane, D., Mallon, P., Lelievre, J. D., Askie, L. M., Kredon, T., ... Boutron, I. (2022). Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *The Cochrane database of systematic reviews*, 12(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015477>
- Hajighahramani, N., Nezafat, N., Eslami, M., Negahdaripour, M., Rahmatbadi, S. S., & Ghasemi, Y. (2017). Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 48, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.010>
- Hamrouni, S., Bras-Gonçalves, R., Kidar, A., Aoun, K., Chamakh-Ayari, R., Petitdidier, E., Messaoudi, Y., Pagniez, J., Lemesre, J. L., & Meddeb-Garnaoui, A. (2020). Design of multi-epitope peptides containing hla class-i and class-ii-restricted epitopes derived from immunogenic *Leishmania* proteins, and evaluation of CD4+ and CD8+ T cell responses induced in cured cutaneous leishmaniasis subjects. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008093>
- Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19), 3098–3100. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX345>
- Heo, L., Park, H., & Seok, C. (2013). *GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
- Hidalgo-Ruiz, M., Mejia-López, S., Pérez-Serrano, R. M., Zaldívar-Lelo de Larrea, G., Ganzinelli, S., Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Hernández-Ortiz, R., Mercado-Uriostegui, M. A., Rodríguez-Torres, A., Carvajal-Gamez, B. I., Camacho-Nuez, M., Wilkowsky, S. E., & Mosqueda, J. (2022). *Babesia bovis* AMA-1, MSA-2c and RAP-1 contain conserved B and T-cell epitopes, which generate neutralizing antibodies and a long-lasting Th1 immune response in vaccinated cattle. *Vaccine*, 40(8), 1108–1115. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2022.01.023>
- Hopke, K., Meyers, A., Auckland, L., Hamer, S., Florin, D., Diesel, A., & Patterson, A. (2021). *Leishmania mexicana* in a central Texas cat: clinical presentation, molecular identification, sandfly vector collection and novel management. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1177/2055116921999595>
- Humberto Pérez-Vega, J., Yanett López-Moreno, C., Ángel López-Valenzuela, J., Rendón-Maldonado, J. G., & Samuel López-Moreno, H. (2009). *Leishmaniasis cutánea causada por Leishmania mexicana en Durango, México. Informe del primer caso clínico*. 145(5). www.anmm.org.mx
- Ishemgulova, A., Hlaváčová, J., Majerová, K., Butenko, A., Lukeš, J., Votýpka, J., Volf, P., & Yurchenko, V. (2018). CRISPR/Cas9 in *Leishmania mexicana*: A case study of LmxBTN1. *PLoS one*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0192723>
- José Antonio Ruiz-Postigo, a S. J. A. M. A. N. M.-E. S. V. S. W. M. O. Z. L. A. B. A. Y. E. G. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly Epidemiological Record*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/>

- Karmakar, S., Volpedo, G., Zhang, W. W., Lypaczewski, P., Ismail, N., Oliveira, F., Oristian, J., Meneses, C., Gannavaram, S., Kamhawi, S., Hamano, S., Valenzuela, J. G., Matlashewski, G., Satoskar, A. R., Dey, R., & Nakhasi, H. L. (2022). Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against Old World visceral leishmaniasis. *NPJ vaccines*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41541-022-00574-X>
- Kashyap, M., Jaiswal, V., & Farooq, U. (2017). Prediction and analysis of promiscuous T cell-epitopes derived from the vaccine candidate antigens of *Leishmania donovani* binding to MHC class-II alleles using in silico approach. *Infection, Genetics and Evolution*, 53, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.022>
- Khan, F., & Kumar, A. (2021). Vaccine Design and Immunoinformatics. En *Advances in Bioinformatics* (pp. 137–149). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6191-1_8
- Khan, M. A. A., Ami, J. Q., Faisal, K., Chowdhury, R., Ghosh, P., Hossain, F., Abd El Wahed, A., & Mondal, D. (2020). An immunoinformatic approach driven by experimental proteomics: In silico design of a subunit candidate vaccine targeting secretory proteins of *Leishmania donovani* amastigotes. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04064-8>
- Khatoon, N., Pandey, R. K., & Prajapati, V. K. (2017). Exploring *Leishmania* secretory proteins to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using immunoinformatics approach. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08842-w>
- Lee, C., Su, B. H., & Tseng, Y. J. (2022). Comparative studies of AlphaFold, RoseTTAFold and Modeller: A case study involving the use of G-protein-coupled receptors. *Briefings in Bioinformatics*, 23(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbac308>
- Liljeroos, L., Malito, E., Ferlenghi, I., & Bottomley, M. J. (2015). Structural and Computational Biology in the Design of Immunogenic Vaccine Antigens. *Journal of immunology research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/156241>
- Li, Y., Xiao, Q., Tang, J., Xiong, L., & Li, L. (2021). Extracellular vesicles: Emerging therapeutics in cutaneous lesions. En *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 16, pp. 6183–6202). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S322356>
- Luiz Mendes Wanderley, J., Decote-Ricardo, D., Holzmuller, P., Geiger, A., Nzoumbou-Boko, R., Pissarra, J., Hamrouni, S., Rodrigues, V., Dauchy, F.-A., Lemesre, J.-L., Vincendeau, P., Bras-Gonçalves, R., & Lyon, U. (2018). *Trypanosomatid infections: How Do Parasites and Their excreted-Secreted Factors Modulate the inducible Metabolism of l-Arginine in Macrophages?* 9, 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00778>
- Lyda, T. A., Joshi, M. B., Andersen, J. F., Kelada, A. Y., Owings, J. P., Bates, P. A., & Dwyer, D. M. (2015). A unique, highly conserved secretory invertase is differentially expressed by promastigote developmental forms of all species of the human pathogen, *Leishmania*. *Molecular and cellular biochemistry*, 404(1–2), 53–77. <https://doi.org/10.1007/S11010-015-2366-6>

- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez, J. A. (s/f). *A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions*. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7/Published>
- Martinelli, D. D. (2022). In silico vaccine design: A tutorial in immunoinformatics. En *Healthcare Analytics* (Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.health.2022.100044>
- Martínez Salazar, M. B., Delgado Domínguez, J., Silva Estrada, J., González Bonilla, C., & Becker, I. (2014). Vaccination with *Leishmania mexicana* LPG induces PD-1 in CD8⁺ and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: a model to assess vaccine efficacy. *Vaccine*, 32(11), 1259–1265. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2014.01.016>
- McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(4), 404–405. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/16.4.404>
- Mcilwee, B. E., Weis, S. E., & Hosler, G. A. (2018). *Incidence of Endemic Human Cutaneous Leishmaniasis in the United States*. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.2133>
- McMahon-Pratt, D., & Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? En *Immunological Reviews* (Vol. 201, pp. 206–224). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x>
- McMahon-Pratt, D., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Zhang, Y., Manson, K., Bergman, C., Rivas, L., Rodriguez, J. F., Lohman, K. L., Ruddle, N. H., & Esteban, M. (1993). Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infection and immunity*, 61(8), 3351–3359. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.8.3351-3359.1993>
- Mishra, V. (2020). Affinity Tags for Protein Purification. *Current protein & peptide science*, 21(8), 821–830. <https://doi.org/10.2174/1389203721666200606220109>
- Moafi, M., Sherkat, R., Taleban, R., & Rezvan, H. (2019). *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *International journal of preventive medicine*, 10(1), 1–6. https://doi.org/10.4103/IJPVM.IJPVM_116_18
- Moll, H., & Berberich, C. (2001). Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology*, 204(5), 659–666. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00105>
- Motamedpour, L., Dalimi, A., Pirestani, M., & Ghaffarifar, F. (2020). In silico analysis and expression of a new chimeric antigen as a vaccine candidate against cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(11), 1409–1418. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.45394.10561>
- Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2015.10.011>

- Naz, K., Naz, A., Ashraf, S. T., Rizwan, M., Ahmad, J., Baumbach, J., & Ali, A. (2019). PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome. *BMC bioinformatics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12859-019-2713-9>
- Negahdaripour, M., Nezafat, N., Eslami, M., Ghoshoon, M. B., Shoolian, E., Najafipour, S., Morowvat, M. H., Dehshahri, A., Erfani, N., & Ghasemi, Y. (2018). Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 58, 96–109. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.12.008>
- Pacakova, L., Harant, K., Volf, P., & Lestinova, T. (2022). Three types of *Leishmania mexicana* amastigotes: Proteome comparison by quantitative proteomic analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1022448>
- Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Dey, R., Satoskar, A., Matlashewski, G., & Nakhasi, H. L. (2021). Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.639801>
- PAHO. (2020). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26(14), 1709–1724. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2008.01.023>
- Panahi, E., Stanistic, D. I., Peacock, C. S., Herrero, L. J., Panahi, E., Stanistic, D. I., Peacock, C. S., & Herrero, L. J. (2021). Protective and Pathogenic Immune Responses to Cutaneous Leishmaniasis. *Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.101160>
- Pasos-Pinto, S., Sánchez-García, L., Sánchez-Montes, S., Rebollar-Tellez, E. A., Pech-May, A., & Becker, I. (s/f). *Genetic Diversity and Prevalence of Leishmania mexicana in Bichromomyia olmeca olmeca in an Endemic Area of Mexico*. <https://doi.org/10.3958/059.042.0417>
- Pasos-Pinto, S., Sánchez-García, L., Sánchez-Montes, S., Rebollar-Tellez, E. A., Pech-May, A., & Becker, I. (2017). Genetic Diversity and Prevalence of *Leishmania mexicana* in *Bichromomyia olmeca olmeca* 1 in an Endemic Area of Mexico. <https://doi.org/10.3958/059.042.0417>, 42(4), 983–994. <https://doi.org/10.3958/059.042.0417>
- Pereira-Filho, A. A., Queiroz, D. C., Saab, N. A. A., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R. V., Araújo, R. N., Bartholomeu, D. C., & Gontijo, N. F. (2023). Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface. *Acta tropica*, 242. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2023.106908>
- Perez, M. A. S., Bassani-Sternberg, M., Coukos, G., Gfeller, D., & Zoete, V. (2019). Analysis of Secondary Structure Biases in Naturally Presented HLA-I Ligands. *Frontiers in Immunology*, 10, 455016. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02731/BIBTEX>

- Pinart, M., Rueda, J. R., Romero, G. A. S., Pinzón-Flórez, C. E., Osorio-Arango, K., Silveira Maia-Elkhoury, A. N., Reveiz, L., Elias, V. M., & Tweed, J. A. (2020). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004834.PUB3>
- Pinheiro, R. O., Pinto, E. F., de Matos Guedes, H. L., Filho, O. A. A., de Mattos, K. A., Saraiva, E. M., de Mendonça, S. C. F., & Rossi-Bergmann, B. (2007). Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine*, 25(14), 2716–2722. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.05.093>
- Pollock, K. G. J., McNeil, K. S., Mottram, J. C., Lyons, R. E., Brewer, J. M., Scott, P., Coombs, G. H., & Alexander, J. (2003). The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(4), 1746–1753. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.4.1746>
- Rabienia, M., Roudbari, Z., Ghanbariasad, A., Abdollahi, A., Mohammadi, E., Mortazavidehkordi, N., & Farjadfar, A. (2020). Exploring membrane proteins of *Leishmania major* to design a new multi-epitope vaccine using immunoinformatics approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105423>
- Rajkhowa, S., Hazarika, Z., & Jha, A. N. (2021). Systems biology and bioinformatics approaches in leishmaniasis. En *Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases* (pp. 509–548). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821100-7.00018-2>
- Rapin, N., Lund, O., Bernaschi, M., & Castiglione, F. (2010). Computational Immunology Meets Bioinformatics: The Use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System. *PLOS ONE*, 5(4), e9862. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009862>
- Rawal, K., Sinha, R., Abbasi, B. A., Chaudhary, A., Nath, S. K., Kumari, P., Preeti, P., Saraf, D., Singh, S., Mishra, K., Gupta, P., Mishra, A., Sharma, T., Gupta, S., Singh, P., Sood, S., Subramani, P., Dubey, A. K., Strych, U., ... Bottazzi, M. E. (2021). Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96863-x>
- Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2020). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA379>
- Rezvan, * H, Rees, R., & Ali, S. A. (2012). Immunogenicity of MHC Class I Peptides Derived from *Leishmania mexicana* Gp63 in HLA-A2.1 Transgenic (HHDII) and BALB/C Mouse Models. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(4), 27. [/pmc/articles/PMC3537470/](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00335-1)
- Ríos-Tostado, J. J., Castillo-Ureta, H., Torres-Montoya, E. H., José, ·, Torres-Avenidaño, I., Olimón-Andalón, V., César, ·, Romero-Higareda, E., Silva-Hidalgo, G., & Zazueta-Moreno, M. (2021). Molecular Detection of *Leishmania (L.) mexicana* (Kinetoplastida: Trypanostomatidae) DNA in *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae) from an Area with Autochthonous Canine Leishmaniasis in Northwestern Mexico. *Acta Parasitologica*, 66, 1055–1058. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00335-1>

- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C., & Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21(12), 2129–2142. <https://doi.org/10.1101/GR.122945.111>
- Ropón-Palacios, G., Chenet-Zuta, M. E., Otazu, K., Olivos-Ramirez, G. E., & Camps, I. (2019). Novel multi-epitope protein containing conserved epitopes from different *Leishmania* species as potential vaccine candidate: Integrated immunoinformatics and molecular dynamics approach. *Computational Biology and Chemistry*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107157>
- Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., Del Rosario García-Miss, M., & Dumonteil, E. (2005). Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*, 23(46–47), 5372–5379. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2005.05.037>
- Rossi, M., & Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*, 30(3), 103–111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>
- Saha, B., & Silvestre, R. (2020). Cytokines in the immunity and immunopathogenesis in leishmaniasis. *Cytokine, October*, 155320. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155320>
- Santana, W., de Oliveira, S. S. C., Ramos, M. H., Santos, A. L. S., Dolabella, S. S., Souto, E. B., Severino, P., & Jain, S. (2021). Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9), e2100336. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202100336>
- Saravia, N. G., Escorcía, B., Osorio, Y., Valderrama, L., Brooks, D., Arteaga, L., Coombs, G., Mottram, J., & Travi, B. L. (2006). Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine*, 24(19), 4247–4259. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2005.05.045>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature reviews. Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.72>
- Seib, K. L., Zhao, X., & Rappuoli, R. (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 5(SUPPL. 5), 109–116. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03939.X>
- Singh, G., Pritam, M., Banerjee, M., Singh, A. K., & Singh, S. P. (2020a). Designing of precise vaccine construct against visceral leishmaniasis through predicted epitope ensemble: A contemporary approach. *Computational Biology and Chemistry*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107259>
- Singh, G., Pritam, M., Banerjee, M., Singh, A. K., & Singh, S. P. (2020b). Designing of precise vaccine construct against visceral leishmaniasis through predicted epitope ensemble: A

- contemporary approach. *Computational Biology and Chemistry*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107259>
- Slathia, P. S., & Sharma, P. (2020). In Silico Designing of Vaccines: Methods, Tools, and Their Limitations. En *Computer-Aided Drug Design* (pp. 245–277). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6815-2_11
- Sousa-Paula, L. C. de, Pessoa, F. A. C., Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2021). Beyond taxonomy: species complexes in New World phlebotomine sand flies. En *Medical and Veterinary Entomology* (Vol. 35, Número 3, pp. 267–283). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/mve.12510>
- Souza, A. E., Bates, P. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (1994). Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, 63(2), 213–220. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90057-4)
- Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., & Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1553-Y>
- Tahamtan, A., Charostad, J., Javad, S., Shokouh, H., & Barati, M. (2017). An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine* 2017 5:3, 5(3), 12315. <https://doi.org/10.5812/JAMM.12315>
- Tejeda-Mansir, A., García-Rendón, A., & Guerrero-Germán, P. (2019). Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 35(1), 46–68. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1560552>
- Tejeda-Mansir, A., & Montesinos, R. (2008). Upstream Processing of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(3), 156–172. <https://doi.org/10.2174/187220808786241015>
- Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Nielsen, H., & Winther, O. (2022). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W228–W234. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC278>
- Van Regenmortel, M. H. V. (2016). Structure-Based Reverse Vaccinology Failed in the Case of HIV Because it Disregarded Accepted Immunological Theory. *International journal of molecular sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS17091591>
- Volpedo, G., Bhattacharya, P., Gannavaram, S., Pacheco-Fernandez, T., Oljuskin, T., Dey, R., Satoskar, A. R., & Nakhasi, H. L. (2022). The History of Live Attenuated Centrin Gene-Deleted *Leishmania* Vaccine Candidates. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11040431>
- Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Holcomb, E. A., Zhang, W. W., Lypaczewski, P., Cox, B., Fultz, R., Mishan, C., Verma, C., Huston, R. H., Wharton, A. R., Dey, R., Karmakar, S., Oghumu, S., Hamano, S., Gannavaram, S., Nakhasi, H. L., Matlashewski, G., & Satoskar, A. R. (2022). Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New

- World cutaneous leishmaniasis. *NPJ vaccines*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41541-022-00449-1>
- von Stebut, E., & Tenzer, S. (2018). Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. En *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 308, Número 1, pp. 206–214). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.002>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>
- Woolums, A. R., & Swiderski, C. (2021). New approaches to vaccinology made possible by advances in next generation sequencing, bioinformatics and protein modeling. *Current Issues in Molecular Biology*, 42, 605–634. <https://doi.org/10.21775/cimb.042.605>
- Yang, J., & Zhang, Y. (s/f). *Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER*. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>
- Yang, Y., Sun, W., Guo, J., Zhao, G., Sun, S., Yu, H., Guo, Y., Li, J., Jin, X., Du, L., Jiang, S., Kou, Z., & Zhou, Y. (2015). In silico design of a DNA-based HIV-1 multi-epitope vaccine for Chinese populations. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(3), 795–805. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1012017>
- Zabala-Peñafiel, A., Todd, D., Daneshvar, H., & Burchmore, R. (2020). The potential of live attenuated vaccines against Cutaneous Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 210, 107849. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2020.107849>

IX. APÉNDICES

Apéndice 1. Herramientas y plataformas utilizadas en el diseño de la vacuna multi-epítomos.

Herramienta/plataforma	Enlace
NCBI RefSeq	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/
VaxiJen v2.0	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html
TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TOPCONS	https://topcons.cbr.su.se/
BLASTp	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins
AlgPred 2.0	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred2/batch_action.php
SecretomeP 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0/
NetGPI-1.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGPI-1.1/
DeepLoc 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/
CELLO v2.5	http://cello.life.nctu.edu.tw/
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
IEDB	http://tools.iedb.org/mhcnp/ http://tools.iedb.org/immunogenicity/
NetMHCpan-4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/
NetMHCpanII-4.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.0/
IFNepitope	http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/predict.php
BepiPred3.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/
ABCpred	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/
ProteinSOL	https://protein-sol.manchester.ac.uk/
PSIPRED 4.0	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
I-TASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/
GalaxyRefine.	https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE
ProSA-web	https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php
SAVESv6	https://saves.mbi.ucla.edu/
CHIMERA1.13	Programa portable (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/)
ClusPro 2.0	https://cluspro.bu.edu/login.php

HDOCK	http://hdock.phys.hust.edu.cn/
Mol* 3D	https://www.rcsb.org/3d-view
C-IMMSIM	http://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/
JCat	http://www.jcat.de/
SnapGene	Programa portable (https://www.snapgene.com/)

Apéndice 2. Antígenos vacunales predichos con la metodología diseñada.

Identificador de RefSeq	Nombre	Antigenicidad	Localización
XP003871548.1	Proteína hipotética conservada	0.6089	Extracelular
XP003871798.1	Beta-fructofuranosidasa putativa	0.5514	Extracelular
XP003871799.1	Proteína sin caracterizar	0.5038	Membrana citoplasmática
XP003871980.1	Proteína parecida a antígeno de superficie	0.5416	Extracelular *
XP003871993.1	Proteína hipotética conservada	0.7341	Membrana citoplasmática
XP003872012.1	Proteína parecida a antígeno de superficie	0.5932	Membrana citoplasmática *
XP003872125.1	Proteína hipotética conservada	0.6265	Membrana citoplasmática
XP003872207.1	Proteína hipotética conservada	0.74	Extracelular
XP003872281.1	Proteína hipotética conservada	0.6786	Membrana citoplasmática
XP003872555.1	Proteína hipotética conservada	0.5463	Extracelular
XP003872579.1	Proteína hipotética conservada	0.678	Membrana citoplasmática
XP003872685.1	Proteína hipotética conservada	0.5083	Membrana citoplasmática
XP003872888.1	Proteína hipotética conservada	0.5395	Membrana citoplasmática
XP003873144.1	3'-nucleotidasa/nucleasa putativa	0.5908	Membrana citoplasmática
XP003873164.1	Proteína hipotética conservada	0.6809	Membrana citoplasmática

XP003873676.1	Proteína hipotética conservada	0.6368	Extracelular
XP003873721.1	Proteína hipotética conservada	0.7385	Extracelular
XP003873846.1	Proteína hipotética conservada	0.5332	Membrana citoplasmática
XP003873875.1	Receptor tipo adenilato-ciclasa B	0.5755	Membrana citoplasmática
XP003873877.1	Receptor tipo adenilato-ciclasa B	0.5714	Membrana citoplasmática
XP003873896.1	Proteína hipotética conservada	0.5422	Extracelular
XP003874114.1	Proteína hipotética conservada	0.5121	Membrana citoplasmática
XP003874117.1	Proteína hipotética conservada	0.6211	Membrana citoplasmática
XP003874871.1	Proteína hipotética conservada	0.5507	Extracelular
XP003874218.1	Proteína transportadora tipo sinaptobrevina (putativa)	0.6153	Membrana citoplasmática *
XP003874415.1	Proteína del complejo de edición de ARN MP18 (putativa)	0.5124	Membrana citoplasmática
XP003874980.1	Proteína hipotética conservada	0.5246	Membrana citoplasmática
XP003875869.1	Proteína hipotética conservada	0.7104	Extracelular
XP003875870.1	Proteína hipotética transmembrana, conservada	0.6732	Membrana citoplasmática
XP003875871.1	Proteína hipotética, función desconocida	0.554	Extracelular
XP003876571.1	Proteína hipotética, función desconocida	0.5264	Membrana citoplasmática
XP003876881.1	Proteína hipotética conservada	0.6789	Membrana citoplasmática
XP003876897.1	Proteína hipotética conservada	0.6752	Membrana citoplasmática
XP003877036.1	X-pro, dipeptidil-peptidasa,serin peptidasa,Clan SC, familia S15 (putativa)	0.6462	Extracelular
XP003877067.1	Proteína hipotética conservada	0.625	Extracelular
XP003877089.1	Proteína hipotética conservada	0.5089	Membrana citoplasmática
XP003877460.1	Proteína hipotética conservada	0.5649	Extracelular
XP003877491.1	Proteína hipotética conservada	0.5856	Extracelular

XP003877530.1	Proteína con repeticiones FG-GAP (putativa)	0.6076	Membrana citoplasmática
XP003877666.1	Proteína de superficie parecida a gp46	0.6687	Extracelular
XP003877867.1	Proteína hipotética conservada	0.5727	Membrana citoplasmática
XP003877983.1	Proteína hipotética conservada	0.5354	Membrana citoplasmática
XP003878412.1	Proteína hipotética conservada	0.557	Extracelular
XP003878438.1	Proteína hipotética, función desconocida	0.6777	Extracelular
XP003878540.1	Proteína parecida a D-alanil-glicil endopeptidasa	0.5146	Membrana citoplasmática
XP003878707.1	Proteína hipotética conservada	0.6434	Extracelular
XP003878753.1	Proteína hipotética conservada	0.6904	Extracelular
XP003878806.1	Proteína hipotética conservada	0.5323	Membrana citoplasmática
XP003879177.1	Proteína hipotética conservada	0.5747	Membrana citoplasmática
XP003879275.1	Proteína hipotética conservada	0.5344	Membrana citoplasmática
XP003879284.1	Proteína hipotética conservada	0.6246	Membrana citoplasmática
XP003879364.1	Proteína hipotética conservada	0.6397	Membrana citoplasmática
XP003879531.1	Proteína hipotética conservada	0.6303	Extracelular
XP003886503.1	Proteína sin caracterizar	0.666	Extracelular

* Proteínas ancladas a GPI