

# Biotecnología aplicada al estudio de enfermedades infecciosas desatendidas: enfoques y logros de la Unidad de Biotecnología y Protozoarios

Leonardo Acuña<sup>1</sup>, Daniela E. Barraza<sup>1</sup> y Cecilia M. Pérez Brandán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología y Protozoarios (UBIPRO), Instituto de Patología Experimental “Dr. Miguel Ángel Basombrío”, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Salta, Argentina. e-mail: acunaleonardo@hotmail.com, barrazadaniela86@gmail.com, perezbrandan@gmail.com

## Acerca de la UBIPRO

La Unidad de Biotecnología y Protozoarios, abreviadamente UBIPRO, es una Unidad de Trabajo que agrupa a investigadores, docentes y becarios del CONICET y de la UNSa, que se desempeñan en el Instituto de Patología Experimental “Dr. Miguel Ángel Basombrío” (IPE. CONICET-UNSa). La conformación de la UBIPRO se oficializó en el 2022, e inicialmente estuvieron a cargo del Dr. Leonardo Acuña y la Dra. Cecilia Pérez Brandán, ambos investigadores del CONICET, docentes universitarios y responsables del laboratorio. En un comienzo, con un grupo reducido de colaboradores, la UBIPRO inició estudios tendientes al desarrollo de biotecnologías sanitarias con impacto social, como ser la obtención de vacunas con antígenos recombinantes y componentes bacterianos. Estas primeras tareas estuvieron financiadas exclusivamente por CONICET y permitieron la incorporación de becarios doctorales para su formación científica. Posteriormente, con la obtención de subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la UNSa y fundaciones como Florencio Fiorini y Bunge y Born se produjo un fortalecimiento institucional que permitió la incorporación de nuevos investigadores y becarios, así como la adquisición de equipamiento científico de última generación. En simultáneo, se establecieron convenios de colaboración con varios centros de investigación locales, nacionales e internacionales en EE.UU., Francia, Italia, España, Canadá y Brasil, lo cual se vio reflejado en el intercambio de becarios para la realización de estadías de formación en laboratorios de referencia en el exterior, trabajos en colaboración y publicaciones en conjunto (Pérez Brandán et al., 2019; Salazar et al., 2023; Vázquez et al., 2023, 2024).

En la actualidad, la UBIPRO está compuesta por tres investigadores del CONICET, cuatro becarios doctorales y estudiantes de grado realizando sus trabajos finales. Además, cuenta con el apoyo de personal técnico del CONICET y colaboradores de diferentes dependencias de la UNSa.

Debido al alto volumen de trabajo efectuado a lo largo del tiempo, la unidad ha logrado consolidarse en la temática de biotecnología aplicada para combatir parásitos causantes de enfermedades endémicas<sup>1</sup>, contando con participación en congresos científicos todos los años y trabajos publicados en importantes revistas científicas.

### Misión

La misión de la UBIPRO es realizar investigaciones biomédicas de vanguardia con el objetivo principal de contribuir al desarrollo de nuevas formas de prevenir y tratar enfermedades parasitarias desatendidas. Generamos conocimiento científico de excelencia usando ideas innovadoras, aplicando biotecnología desde la provincia donde viven las personas con estas enfermedades.

Otro foco central es formar recursos humanos altamente capacitados en temas de enfermedades infecciosas, microbiología y biotecnología. Para ello, desde la UBIPRO se busca que los estudiantes que se incorporan cuenten con becas de investigación para realizar pasantías, tesis de finalización de grado y tesis de doctorados.

Por último, se promueve la transferencia al sector público y privado local, nacional e internacional de todos los avances que se realizan desde la UBIPRO, así como el apoyo científico y técnico en prevención y tratamientos.

### Líneas de investigación

Las líneas de investigación de la UBIPRO, se enfocan en desarrollar y estudiar nuevos medicamentos y tratamientos para combatir dos tipos de enfermedades infecciosas desatendidas: Chagas y leishmaniasis, cuyas principales características se resumen en la Tabla 1.

Existe un grupo heterogéneo de enfermedades infecciosas que comparten características especiales y que son conocidas con el nombre de Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs, por sus siglas en inglés). Las NTDs afectan principalmente a poblaciones de bajos recursos con atención primaria de salud escasa o nula, por consiguiente, las industrias farmacéuticas y las grandes corporaciones mundiales no enfocan su atención en estas patologías. Debido a esto, resulta imprescindible la participación e inversión del estado para combatir estas enfermedades. Actualmente la Organización Mundial de la Salud reconoce 15 enfermedades desatendidas, encontrándose entre

---

<sup>1</sup>Endémica: que es propio o característico de una localidad o región determinada. Se aplica a enfermedades o fenómenos naturales limitados a una zona geográfica concreta. Zona endémica: zona o región en la que una enfermedad es endémica, es decir, donde existe de forma permanente o habitual, afectando de modo característico a la población de esa zona.

ellas la Enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, ambas de suma importancia en el norte argentino y ampliamente estudiadas en el IPE. Estas enfermedades son causadas por parásitos intracelulares pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y desafortunadamente hasta la fecha, no se ha logrado desarrollar una vacuna que genere una protección total y duradera para ninguna de ellas.

ENFERMEDAD		
CARACTERÍSTICAS	LEISHMANIASIS	CHAGAS
AGENTE CAUSAL	Parásito protozoario del género <i>Leishmania</i> .	Parásito protozoario <i>Trypanosoma cruzi</i> .
TRANSMISIÓN	Vectorial: por picadura de flebótomos (insecto hematófago similar al mosquito) hembras infectadas con el parásito.	Vectorial: contacto con heces de vinchucas infectadas.  Congénita: de madre a hijo. Transfusión de sangre. Trasplante de órganos. Accidental u oral.
SÍNTOMAS	Existen diferentes formas clínicas: -Leishmaniasis tegumentaria cutánea y mucocutánea. La primera produce úlceras en la piel, heridas que no cicatrizan, a veces cicatrices permanentes. Y la segunda, lesiones en mucosas orales, nasales y faríngeas. -Leishmaniasis visceral produce fiebre prolongada, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia (agrandamiento del hígado y del bazo), puede causar la muerte.	Existen 2 fases: Fase aguda o inicial: produce fiebre, fatiga, dolor de cuerpo y cabeza, pérdida de apetito, diarrea y vómitos.  Si no se trata la infección evoluciona a una fase crónica donde se pueden producir graves problemas intestinales y cardíacos.
TRATAMIENTOS	Leishmaniasis cutánea: antimonio de meglumina, anfotericina B y miltefosina. Leishmaniasis visceral: anfotericina B, miltefosina y paromomicina. En la mayoría de los casos se administran inyecciones diariamente durante largos periodos.	Fase aguda: benznidazol o nifurtimox. Administración oral.  Fase crónica: tratamiento para síntomas específicos.
DISPONIBILIDAD DE VACUNAS PREVENTIVAS	No hay vacuna disponible.	No hay vacuna disponible.
MÉTODOS DE PREVENCIÓN ACTUALES	Uso de repelentes y mosquiteros. Control de vectores y eliminación de criaderos. Protección durante actividades al aire libre. Monitoreo y tratamiento de lesiones cutáneas	Uso de repelentes y mosquiteros. Control de vinchucas y mejoras en vivienda. Evaluación y control en transfusiones de sangre y trasplantes. Detección y tratamiento temprano de la enfermedad en áreas endémicas.

Tabla 1. Características generales de las enfermedades de Chagas y leishmaniasis.

La Enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es una problemática actual y desatendida en muchos países del mundo. Argentina posee una de las tasas chagásicas más altas del mundo siendo endémica en la región noroeste del país (Dirección Nacional de Epidemiología, 2017).

Otra enfermedad tropical desatendida que cada vez se expande más y ha llegado a centros urbanos es la leishmaniasis. Se denomina leishmaniasis a un grupo de enfermedades causadas por protozoarios flagelados del género *Leishmania*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las mantiene en la lista de alta prioridad y recomienda su investigación en diversos aspectos. La leishmaniasis tegumentaria Americana (LTA) es endémica en la Argentina y causa una morbilidad considerable en los pacientes que la padecen, quienes en su mayoría son trabajadores rurales. La enfermedad les quita con frecuencia la capacidad de trabajar, representando un fuerte impacto en su sustento económico y bienestar. Si los casos de LTA permanecen sin diagnóstico o tratamiento, pueden derivar en otras formas más graves, llevando incluso a la muerte (SWGL, 2004). Además, cerca del 80% de los pacientes desarrollan efectos adversos y alrededor de un 20% no responde a los tratamientos con las drogas actuales de referencia. Esto se debe, en general, a que estas drogas producen serios efectos tóxicos en los pacientes, además de que deben ser administradas mediante inyecciones diarias, lo cual limita su uso en las zonas endémicas (Mears et al., 2015; SWGL, 2004).

En este contexto, los proyectos de trabajo de la UBIPRO tienen como propósito el desarrollo de medicamentos y nuevos tratamientos. Para ello, se siguen dos líneas principales de investigación. Una de ellas consiste en la obtención de proteínas recombinantes y plataformas para la vehiculización de estas proteínas. Estas plataformas se ensayan como vacunas contra enfermedades parasitarias. Para ello, se diseñan racionalmente y estudian los dos componentes principales de las vacunas: antígenos y adyuvantes. El antígeno es la molécula ajena al organismo que es reconocida por el sistema inmune como foránea, mientras que el adyuvante es la sustancia que potencia la respuesta contra dicho antígeno. Para este diseño nos enfocamos en sus características inmunológicas, efectividad y seguridad. Si bien se han realizado grandes esfuerzos en torno al desarrollo de vacunas contra los patógenos causantes de enfermedades tropicales causadas por protozoarios, ninguna vacuna había sido aprobada para su uso en humanos. Sin embargo, recientemente en un claro momento histórico, la OMS recomendó administrar en niños la vacuna RTS,S/AS01 para prevenir el paludismo por *Plasmodium falciparum* en las regiones donde la transmisión sea moderada o alta, abriendo las puertas a un mayor interés en el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades (WHO, 2019). Esto destaca el futuro impacto que tiene esta línea de investigación de la UBIPRO en la población del norte argentino y en las poblaciones que la requieran. El objetivo del desarrollo de estas vacunas

consiste en que puedan ser utilizadas de forma profiláctica, es decir, como medidas de prevención primaria capaces de evitar el desarrollo clínico de la enfermedad. De presentarse algún caso de infección a pesar de la vacunación, el objetivo secundario de una vacuna profiláctica es que disminuya la gravedad de los síntomas y complicaciones asociadas a la enfermedad.

La otra línea de la UBIPRO, consiste en la búsqueda de nuevos tratamientos para estas enfermedades. El tratamiento se refiere al conjunto de medidas terapéuticas utilizadas para combatir una enfermedad, modificar su evolución y lograr la recuperación del paciente. En nuestro caso, esta búsqueda se orienta a la administración de fármacos cuando ya se contrajo la infección. En este aspecto, el principal enfoque es el reposicionamiento de fármacos (“repurposing”). Para ello se estudia la efectividad y los mecanismos de acción contra parásitos de medicamentos desarrollados originalmente para tratar otras enfermedades. Resulta ser que, además de las escasas inversiones farmacéuticas, el descubrimiento de nuevas sustancias con posterior desarrollo, producción, aceptación, registro y aplicación en salud resulta demasiado largo, costoso e inefectivo. En este contexto, el reposicionamiento de fármacos surge como una propuesta viable y muy prometedora. Posee algunas ventajas frente al descubrimiento tradicional de drogas debido a que: i) existe información disponible respecto a la seguridad y calidad del fármaco, ii) si se mantienen las dosis habituales, solo se debe demostrar la efectividad, iii) el desarrollo tradicional requiere entre 11 y 15 años, mientras que el reposicionamiento pasa directamente a la fase clínica 2 (período acortado de 5 a 6 años) (Andrade Neto et al., 2018).

### Flujo de trabajo

El proceso de investigación y desarrollo de la UBIPRO se inicia en el planteo de la problemática y búsqueda de posibles soluciones. Respecto a la línea de trabajo consistente en desarrollar vacunas, se comienza diseñando de forma racional los componentes de estos nuevos medicamentos contra *T. cruzi* y *Leishmania spp.* Estos componentes son los antígenos y los adyuvantes. Nuestros antígenos se tratan en general de proteínas, mientras que nuestros adyuvantes se tratan en general de componentes bacterianos como sistemas de vehiculización y entrega de las proteínas.

Para la producción de proteínas, se utilizan técnicas de ingeniería genética para obtenerlas en un microorganismo de fácil manipulación. Luego se purifican y caracterizan siguiendo normas de control de calidad.

Posteriormente se realizan pruebas *in vitro* para evaluar el efecto que pueden presentar estos compuestos sobre los parásitos, y así poder entender cómo y dónde actúan a nivel molecular. Los

ensayos *in vitro* consisten en pruebas experimentales realizadas sobre los parásitos crecidos en medios de cultivo y condiciones de laboratorio. Permiten evaluar de manera preliminar los posibles efectos de compuestos fuera de las condiciones complejas del organismo. Se busca dilucidar los mecanismos y blancos farmacológicos de acción sobre los parásitos, estableciendo dosis efectivas, antes de realizar ensayos sobre modelos animales. En el caso de la línea de investigación acerca del reposicionamiento de medicamentos, nuestro flujo de trabajo comienza en esta etapa de evaluación *in vitro*. Finalmente, se llevan a cabo ensayos en modelos animales (*in vivo*), evaluando exhaustivamente la eficacia preventiva y/o terapéutica de los compuestos, de acuerdo a estrictos protocolos éticos. Estas pruebas experimentales consisten en evaluar los efectos de nuestros fármacos bajo condiciones fisiológicas reales. Se monitorea la eficacia, toxicidad, interacciones con otros fármacos, respuesta inmune, entre otros parámetros. Estos ensayos *in vivo* permiten validar los resultados obtenidos previamente en ensayos *in vitro*. Los resultados de ambas líneas de trabajo son comunicados en congresos y en revistas científicas de excelencia a medida que van atravesando sus diferentes etapas.

### 1. Diseño radical de vacunas

En la UBIPRO, uno de los objetivos principales es el diseño racional de nuevas vacunas para el tratamiento de las NTDs como la leishmaniasis y el Chagas. En este sentido, en primer lugar se decide cuáles son las características que se desean conseguir para los compuestos a ensayar (antígeno y/o adyuvante) y se los diseña previamente de manera teórica. Esto implica la búsqueda bibliográfica y el uso de herramientas informáticas para saber cómo obtener los compuestos candidatos capaces de actuar sobre los blancos terapéuticos seleccionados. Se toma como punto de partida el conocimiento que existe sobre cómo funcionan otros compuestos ya probados. Se estudia específicamente en qué parte o proceso actúan esas sustancias para generar un efecto. Luego, basándose en ese conocimiento inicial sobre los mecanismos de acción, se diseñan nuevos productos con la intención de que causen un efecto similar o aún mejor contra el microorganismo patógeno.

### 2. Producción de vacunas

En esta etapa, una vez diseñada la proteína de interés, comienzan los pasos para producirla a gran escala en el laboratorio. Se estudian con detenimiento qué bacterias u otros microorganismos servirían para obtenerla, así como las herramientas y técnicas disponibles para introducirle los genes deseados. Se utilizan técnicas moleculares avanzadas para modificar los genes bacterianos. Esto nos permite introducir pequeños cambios en el ADN de las bacterias que usarán para producir

la proteína de interés. Mediante reacciones en cadena de la polimerasa, conocidas como PCR, se agregan secuencias genéticas especiales. Estas cumplen funciones como facilitar la identificación de la proteína una vez creada o permitir su separación fácil de otras sustancias dentro de la bacteria.

A continuación, se utilizan cepas de *Escherichia coli* optimizadas para lograr altos rendimientos en la expresión y purificación. En algunos casos se utilizan otros tipos de bacterias GRAS (del inglés, *generally recognized as safe*) (Figura 1). Las bacterias recombinantes se cultivan y las proteínas se aíslan mediante precipitación selectiva, fraccionamiento y cromatografías. Esto permite obtener proteínas de gran pureza listas para su caracterización. Se emplean técnicas electroforéticas, inmunológicas, cromatográficas, microscópicas y espectroscópicas para analizar parámetros como peso molecular, estructura primaria y presencia de modificaciones químicas.

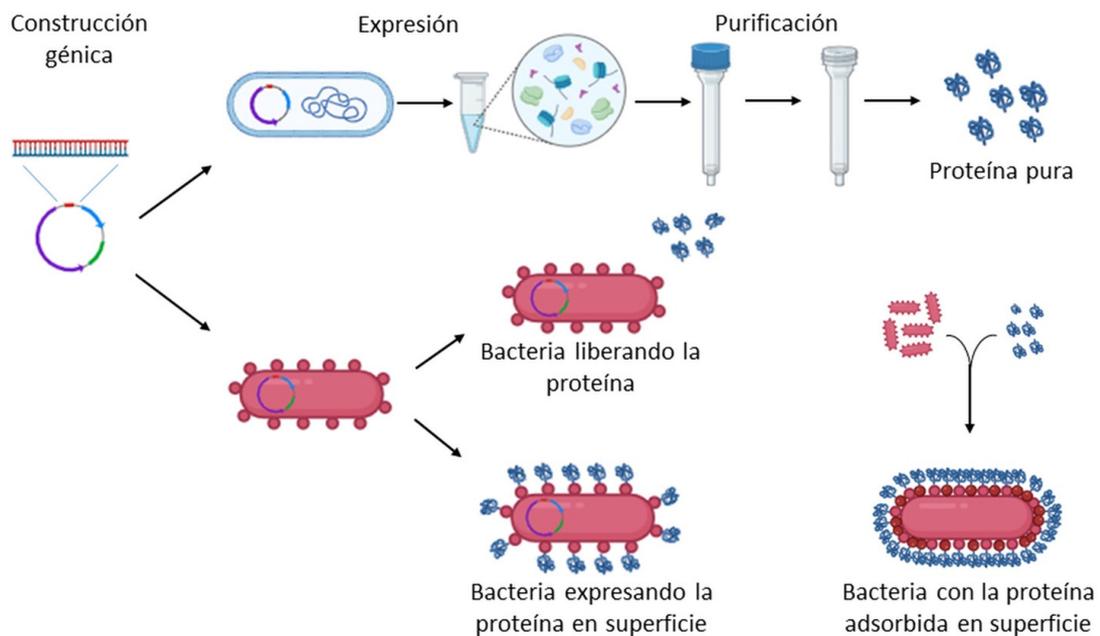


Figura 1. Diseño y producción de proteínas y formulaciones de interés biotecnológico basadas en componentes bacterianos. Se representa el flujo del proceso de obtención de proteínas mediante herramientas de ingeniería genética, su expresión en sistemas de producción microbianos y posterior formulación de bioproductos.

Finalmente, se realizan formulaciones completas a ensayar como vacunas, que incluyen estas proteínas purificadas, ya sea solas o unidas a componentes bacterianos. Cabe destacar que estas plataformas de expresión, purificación y vehiculización de proteínas también sirven para otras aplicaciones de interés biotecnológico en diferentes industrias como ser la alimentaria (Acuña et al., 2020).

### 3. Evaluación *in vitro*: identificación de actividades biológicas, mecanismos y blancos de acción

Para el caso de las vacunas preventivas, una vez obtenidas las formulaciones, los ensayos posteriores se centran en modelos *in vivo* ya que se requiere determinar su eficacia en un organismo superior. Sin embargo, cuando ensayamos tratamientos terapéuticos (posterior infección) de leishmaniasis y Chagas, previo a los ensayos en animales se realiza la evaluación *in vitro* de los compuestos. Respecto a la línea de investigación tendiente al reposicionamiento de fármacos, los ensayos se inician en esta etapa, ya que se parte de sustancias que han sido purificadas y caracterizadas previamente. Se estudian los efectos de las sustancias de interés contra *Leishmania spp.* y *T. cruzi* describiendo y cuantificando las alteraciones provocadas, con el fin de determinar su capacidad inhibidora y caracterizar dicha actividad. Esto es posible mediante diversas técnicas bioquímicas y biofísicas, observando efectos a niveles celulares y moleculares. También caracterizamos otras acciones biológicas de las sustancias de interés como ser la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiagregante, entre otras (Acuña et al., 2019). Además, se busca identificar los posibles blancos de acción de los compuestos sobre los parásitos ya sea de un modo directo o indirecto. Por otra parte, se prueban los efectos causados por los compuestos sobre células de organismos superiores (células hospedadoras de los parásitos) (Figura 2). De esta forma, luego de un análisis exhaustivo, se seleccionan aquellas sustancias que presentan mayores posibilidades de éxito ya sean empleadas de manera individual o en combinaciones con otras.

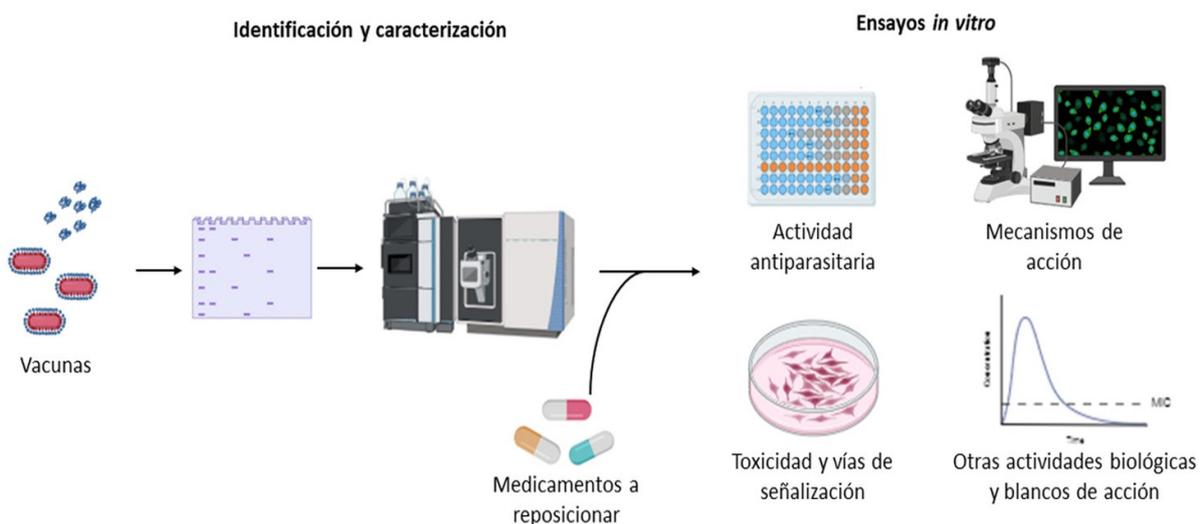


Figura 2. Ensayos biológicos *in vitro* de vacunas y/o medicamentos para su reposicionamiento. Se muestra un esquema del protocolo experimental para la evaluación de nuevos candidatos vacunales o fármacos de reposicionamiento, mediante ensayos de actividad biológica sobre cultivos celulares, parásitos a nivel extracelular, previo a estudios preclínicos en modelos animales.

**4. Evaluación in vivo: ensayos preclínicos. Evaluación de eficacia y análisis de elementos moleculares involucrados en la prevención y/o tratamiento**

Conociendo las actividades biológicas y modos de acción de las sustancias de interés, se definen cuáles serán las condiciones que merecen ser estudiadas en profundidad en modelos *in vivo*. En esta etapa, se realizan ensayos que permiten realizar una evaluación de manera integral de la eficacia de los nuevos tratamientos. Para ello la UBIPRO, cuenta con modelos experimentales de infección establecidos en roedores, que siguen rigurosamente los protocolos establecidos por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias de la Salud (UNSa).

En el caso de las vacunas, se prueban distintas opciones de aplicación para evaluar su efectividad. En un esquema usual, primero se aplica la vacuna para inmunizar. Luego, después de un tiempo, se exponen a los animales de estudio controladamente al parásito que causa la enfermedad. De esta forma se pueden analizar variables como el nivel de protección otorgado, la cantidad de parásitos presentes y cómo transcurre naturalmente la infección. Para ello, se realiza un análisis de manera exhaustiva de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la prevención o tratamiento de la patología, incluyendo la presencia de parásitos en sangre y tejidos, variables bioquímicas y respuestas celulares específicas (Figura 3).

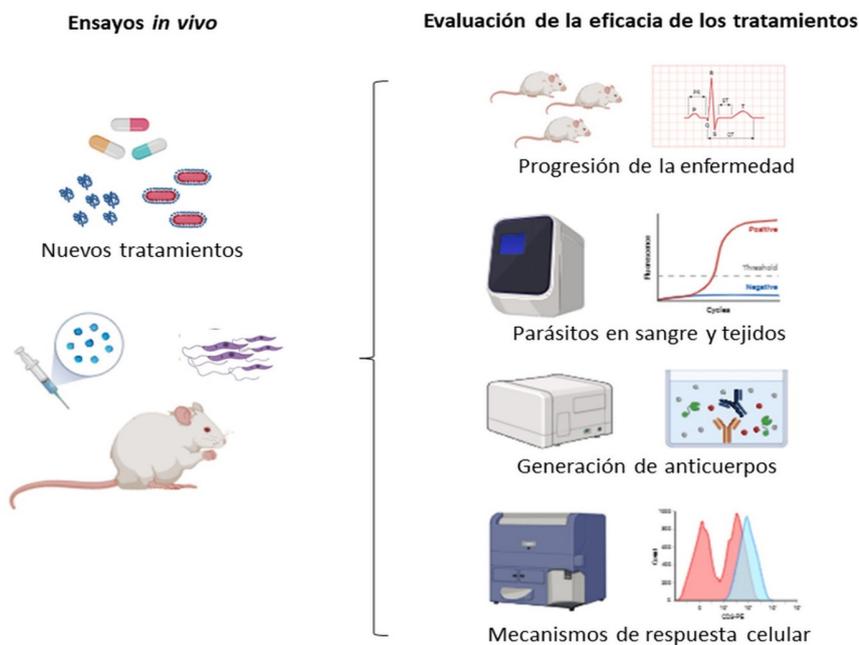


Figura 3. Ensayos preclínicos en modelos animales de experimentación. Se estudian esquemas de prevención, así como de tratamientos posteriores a la infección. La figura muestra un diagrama del flujo metodológico para la realización de ensayos *in vivo* que permitan validar la eficacia y seguridad de nuevas vacunas y tratamientos, tanto con fines profilácticos como terapéuticos, utilizando modelos animales de infección experimental.

Este riguroso proceso evalúa todas las dimensiones de la infección y la eficacia de las intervenciones con el fin de cumplir con las normas de las 3R (reducir, refinar y reemplazar) para el uso compasivo de animales en experimentación.

## REFERENCIAS

ACUÑA L, S HAMADAT, NS CORBALÁN, F GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA, M DOS-SANTOS-PEREIRA, J ROCCA, J SEPÚLVEDA DÍAZ, E DEL-BEL, D POPY-GARCÍA, RN CHEHÍN. 2019. Rifampicin and its derivative rifampicin quinone reduce microglial inflammatory responses and neurodegeneration induced in vitro by  $\alpha$ -synuclein fibrillary aggregates. *Cells*, 8: 776.

ACUÑA L, N CORBALAN, M QUINTELA-BALUJA, J BARROS-VELAZQUEZ, A BELLOMIO. 2020. Expression of the hybrid bacteriocin Ent35-MccV in *Lactococcus lactis* and its use for controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in milk. *International Dairy Journal*, 104: 104650.

ANDRADE NETO VV, EF CUNHA JUNIOR, V FAIOES, TP MARTINS, RL SILVA, LL LEON, ECT SANTOS. 2018. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Frontiers in Bioscience*, 23: 967-996.

Dirección Nacional de Epidemiología. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. 2017. Boletín Integrado de Vigilancia. <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n345-se4-02022017>

MEARS ER, F MODABBER, R DON, GE JOHNSON. 2015. A review: the current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 9: e0003889.

PÉREZ BRANDÁN C, AC MESIAS, L ACUÑA, TL TEIXEIRA, CV DA SILVA. 2019. Evaluation of pathogen P21 protein as a potential modulator of the protective immunity induced by *Trypanosoma cruzi* attenuated parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114: e180571.

SALAZAR PB, M FANZONE, BA ZABALA, MJ RODRIGUEZ VAQUERO, E CILLI, PA BARROSO, C MINAHK, L ACUÑA. 2023. A byproduct from the Valles Calchaquíes vineyards (Argentina) rich in phenolic compounds: a tool against endemic *Leishmania* dissemination. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 97377-97385. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29276-0>

Scientific Working Group on Leishmaniasis. Meeting (2004: Geneva, Switzerland) & UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2004. Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis, Geneva, 2-4 February, 2004. <https://iris.who.int/handle/10665/68897>

VÁZQUEZ ME, AC MESÍAS, L ACUÑA, J SPANGLER, B ZABALA, C PARODI, M THAKUR, E OH, SA WALPER, CP BRANDÁN. 2023. Exploring the performance of *Escherichia coli* outer membrane vesicles as a tool for vaccine development against Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 118: e220263. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220263>

VÁZQUEZ ME, BA ZABALA, AC MESÍAS, L BISCARI, CD KAUFMAN, A ALLOATTI, F SIANO, G PICARIELLO, NS CORBALÁN, BA LENIS. 2024. Protective Efficacy of the Epitope-Conjugated Antigen N-Tc52/TSkb20 in Mitigating *Trypanosoma cruzi* Infection through CD8+ T-Cells and IFN $\gamma$  Responses. *Vaccines*, 12: 621.

WHO. 2019. WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>