

Hacia una nanovacuna colombiana para la *leishmaniasis*

La producción de una nanovacuna contra la leishmaniasis, protegería a los animales con unas cantidades sumamente bajas de la sustancia activa, reduciendo la toxicidad y en consecuencia los efectos adversos. En la actualidad el GIM avanza en el establecimiento del modelo animal y en el descubrimiento de adyuvantes, antígenos y sistemas de liberación, para el desarrollo de esta vacuna.

José R. Ramírez Pineda

Las vacunas son la estrategia de prevención de enfermedades más grandiosa inventada por el hombre. Ellas no solo salvan anualmente más de 8 millones de vidas, lo que significa una vida cada cinco segundos, sino que también se reconocen como la medida de control de enfermedades de mejor relación costo/beneficio conocida hasta ahora en toda la historia de la medicina. Sin embargo, muchas enfermedades siguen aquejando al ser humano y entre ellas las infecciones representan una gran carga para la sociedad. Las enfermedades infecciosas ocasionan muchas muertes e incapacidades y consumen una gran cantidad de recursos económicos debido a que los costos hospitalarios y de medicamentos para su tratamiento suelen ser muy altos.

Gracias a los espectaculares avances de la ciencia en las últimas décadas, lo que incluye el mejor conocimiento de los genomas humanos y de los microorganismos, de las moléculas que los componen y sus funciones, de la forma en que dichos microorganismos logran establecerse durante la infección, junto con los grandes progresos en la informática y la nanotecnología, se tiene una gran expectativa de que la década 2010-2020 será una de nuevas y mejores vacunas para la humanidad.

Uno de los retos que viene asumiendo el grupo Inmunomodulación (GIM) es desarrollar una vacuna efectiva para la *leishmaniasis*. Para esto, el grupo ha establecido un modelo animal en ratones albinos que reproduce la enfermedad que ocurre en humanos, con el fin de entenderla mejor, de diseñar posibles terapias y vacunas y de evaluar en dichos animales si estas efectivamente funcionan. Los esfuerzos han llevado a la obtención de cepas del microbio obtenidas a partir de pacientes que sufren la enfermedad y su cultivo de manera permanente en el laboratorio. Gracias a los trabajos de investigación de varios estudiantes de pregrado y posgrado, se logró identificar un aislado que, cuando es inoculado en ratones, ocasiona una enfermedad muy similar a la que sufren los seres humanos. El poder inducir en ratones la misma enfermedad de manera reproducible y controlada, permite que podamos investigar diferentes aspectos del microbio y del sistema inmune y de esta manera poder proponer posibles formas de controlarla o prevenirla. La base de esta aproximación es que existe una gran similitud entre el sistema inmune humano y el de los ratones, y es en buena medida gracias a ellos, que la medicina ha avanzado tanto en las últimas décadas.

Una vacuna está típicamente formada por tres componentes: El antígeno, el adyuvante y el sistema de liberación. El antígeno es (son) la(s) parte(s) del microbio contra las cuales se quiere que el sistema inmune humano responda, de tal manera que cuando aparezca la infección, las defensas atacan al microbio a través de dichas partes y de esta manera evitan que éste se multiplique y cause la enfermedad. El adyuvante, como su nombre lo indica, es una sustancia que ayuda a potenciar dicha respuesta. Más precisamente, se trata de algo que hace que el sistema inmune humano perciba la presencia del antígeno como algo contra lo que hay que establecer defensas. Finalmente, el sistema de liberación se refiere a la forma física en la que se le administra el antígeno y el adyuvante al cuerpo humano. Por ejemplo, es posible purificar algunos componentes del microbio (antígeno), mezclarlos con sustancias que se saben que potencian la respuesta (adyuvante) y juntos incorporarlos en paquetes o vesículas de tamaños muy pequeños, de escala nanométrica, es decir de la millonésima parte de un milímetro (sistema de liberación), y el resultado es una nanovacuna potencial. Esto, por supuesto, es más complicado de lo que se expone aquí, y requiere de la participación de expertos de diversas disciplinas como la biología, la física, la química, la ingeniería, entre otras.

En el GIM, gracias a los proyectos de varios estudiantes de pregrado y posgrado hemos logrado identificar un adyuvante que funciona como componente protector esencial de una vacuna experimental para la *leishmaniasis* cutánea. De esto nos dimos cuenta cuando fragmentamos el cuerpo del parásito por medio de ciclos de congelamiento y calentamiento, y la preparación de proteínas (antígenos) resultante de dicho procedimiento fue mezclada con un inmunopotenciador llamado CpG (adyuvante), para ser inyectada a los ratones. Lo que notamos fue que cuando se vacunan los ratones con una inyección subcutánea de dicha mezcla y varios meses después se infectan con el microbio virulento los animales no desarrollan enfermedad alguna. Esto fue bastante notable, ya que todos los ratones que fueron infectados, sin haber sido vacunados previamente, sufrieron de la enfermedad. Es más, los ratones que se vacunaron con uno solo de los componentes de la mezcla (es decir los antígenos o los CpG) desarrollaron la enfermedad igual que los no vacunados, lo que demuestra la necesidad de la presencia simultánea de ambos componentes en la vacuna. Estos

trabajos nos llevaron a proponer a los CpG como un adyuvante protector para la *leishmaniasis*.

Una vacuna que contenga CpG como adyuvante, sin embargo, puede ser un poco tóxica para humanos debido, justamente, a que es muy potente. Una forma de limitar su poder tóxico conservando su poder adyuvante benéfico es incorporándolo en nanoestructuras. De esta manera, gracias a la participación de varios profesionales y estudiantes lo que hicimos fue empaquetar nuestros fragmentos del microbio con CpG en unas vesículas de 500-800 nanómetros que tienen una carga positiva llamadas liposomas catiónicos, a manera de nanovacuna, y volvimos a probarla en ratones. Lo que encontramos es que la nueva nanovacuna protege a los animales con unas cantidades sumamente bajas, mucho menores de las requeridas para proteger a los animales con la vacuna inicial. Y más importante aún, que con esta mínima cantidad de nanovacuna los efectos tóxicos o adversos en los ratones se reducen en más de un 50%. Esto nos demostró el poder de las nanovacunas no solamente para la *leishmaniasis* sino también para cualquier enfermedad infecciosa o para el cáncer. En la actualidad el grupo investiga cómo podría mejorarse el poder protector y la seguridad de las nanovacunas manipulando el tamaño, la carga y el contenido de antígenos y adyuvantes. Más aun, gracias a la explosión de nuevos nanomateriales y nanoestructuras, tales como las nanopartículas lipídicas, poliméricas y peptídicas, estamos preparando proyectos de investigación que permitan evaluar y seleccionar las mejores candidatas para las estrategias de vacunación.

Aunque los resultados obtenidos hasta ahora suenan muy prometedores, es necesario aclarar que los requerimientos de las vacunas modernas exigen que estén conformadas por componentes definidos del microbio y no de fragmentos de él. En otras palabras, se requiere descubrir cuál o cuáles de las moléculas que están presentes en nuestras preparaciones crudas son las que median el efecto protector. En la actualidad, nuestro grupo está desarrollando proyectos que permiten la separación controlada de los componentes del parásito con el fin de acercarnos cada vez más a dichas identificaciones. Esta tarea sin embargo es el equivalente a la búsqueda de una aguja en un pajar. Por esta razón, también estamos explotando métodos más sofisticados de genómica, transcriptómica, proteómica



y bioinformática a través de varios proyectos de tesis de estudiantes de pregrado y posgrado con el fin de acelerar la identificación de los candidatos. Esperamos que en unos años hayamos logrado identificar unos 10-12 candidatos de antígenos para ser formulados en nuestra nanovacuna contra la *leishmaniasis*. Para esto, será necesario producir en grandes cantidades dichos componentes por métodos de ingeniería genética, lo cual consiste en utilizar algunas bacterias como “biofábricas” de las moléculas identificadas y normalmente producidas solamente por el parásito. Una vez producidas, dichas preparaciones serán probadas nuevamente en ratones y, de obtener los resultados esperados, se podrá pensar en futuras pruebas en humanos.

Lo presentado hace parte del trabajo realizado durante los últimos 6-7 años, por un equipo de estudiantes de pre y posgrado, de auxiliares de investigación y de personal de apoyo, liderados por el coordinador del GIM, y en colaboración con otros grupos de investigación de la Universidad de Antioquia (Grupo GISB, BCEI, GIEPI) y extranjeros (Universidad Federal de Santa Catarina en Florianopolis, Brasil).

¿Qué es la leishmaniasis?

La *leishmaniasis*, conocida como picadura de pito, es una enfermedad infecciosa transmitida por un insecto durante la picadura. Este insecto suele vivir en zonas tropicales y subtropicales y es un factor determinante para que se presente la enfermedad. Una vez inoculado el microbio en la piel, rápidamente se incorpora en células llamadas macrófagos, en donde se multiplica muchas veces y luego de reventarla, logra invadir muchas otras células que llegan allí con el fin de controlarlo. Con el tiempo, la multiplicación del parásito lleva a la formación de úlceras crónicas en la piel o, debido a que puede viajar por la sangre al resto del cuerpo, puede instalarse en la mucosa de la nariz o inclusive llegar a órganos internos como el bazo, el hígado o la médula ósea. Aunque muchas personas logran controlar la infección, sin que siquiera se den cuenta que están infectadas, muchas otras personas desarrollan una de las formas típicas de la *leishmaniasis*: la cutánea, la mucocutánea o la visceral. La *leishmaniasis* es una enfermedad fuertemente asociada con la pobreza y con los conflictos sociales de los países menos desarrollados. Es muy fácil encontrar casos en zonas rurales deprimidas, en personas secuestradas que han permanecido por años en la selva, y en personas pertenecientes a los grupos protagonistas del conflicto armado colombiano, como son los soldados, las guerrillas y los paramilitares.

Cuando los ratones son inoculados en la piel con parásitos *Leishmania panamensis*, desarrollan úlceras similares a las que se observan en humanos con Leishmaniasis cutánea (foto superior). Estas lesiones no incapacitan al animal, ni son dolorosas. Cuando los ratones son inmunizados con la vacuna, semanas o meses antes de la infección, se protegen completamente de sufrir la enfermedad (foto inferior).