


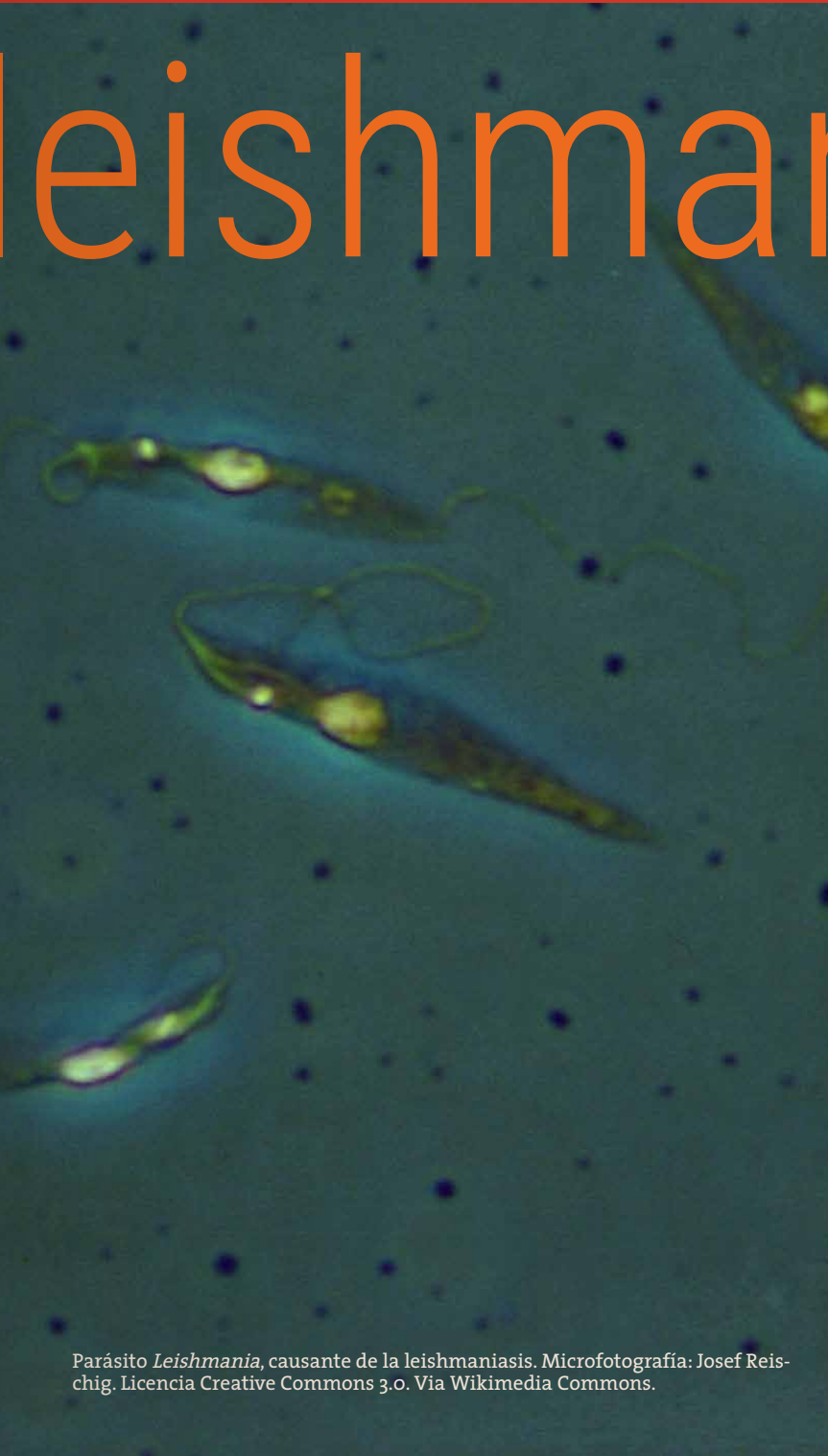
Desarrollando vacunas químicas para la leishmaniasis

Sin duda, las vacunas son una de las más poderosas armas de la humanidad contra las enfermedades infecciosas. Sin embargo, desarrollarlas es complicado; y mientras más complejo es el organismo infeccioso —como en el caso del parásito causante de la leishmaniasis— más difícil es tal proceso. Por eso, los avances en vacunas de última generación abren importantes frentes de investigación para ayudarnos a combatir estas infecciones parasitarias.

10 μm

A microscopic image showing several Leishmania parasites. The parasites are elongated, spindle-shaped organisms with a distinct nucleus and kinetoplast. They are surrounded by numerous small, dark, circular structures, likely host cells or other microorganisms. The background is a light blue color.

o una vacuna mente definida leishmaniasis



Natalia García Valencia.

Microbióloga y Bioanalista.

David Ernesto Bautista Erazo.

Químico, químico farmacéutico, magíster en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias.

José Robinson Ramírez Pineda.

Bacteriólogo y laboratorista clínico, magíster en Biología (Genética), doctor en Inmunología (Inmunomodulación).

Integrantes del Grupo Inmunomodulación — GIM—, Corporación Académica para el Estudio de Patologías Tropicales —CAEPT— de la Universidad de Antioquia.

Janny Alexander Villa Pulgarín.

Microbiólogo y bioanalista, doctor en Biología y Clínica del Cáncer. Integrante del Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud de la Corporación Universitaria Remington.



Las vacunas son herramientas maravillosas inventadas por la humanidad para luchar contra las enfermedades infecciosas con un balance costo-beneficio sorprendentemente favorable. Actúan de una manera muy interesante: esencialmente, engañan al cuerpo para que este crea que está siendo infectado por algún agente que pueda causar una enfermedad, lo que denominamos patógeno. Esto activa el sistema inmunitario para que registre las características del invasor, las memorice y, así, pueda recordarlo si alguna vez nos invade realmente. En ese caso, ya estaremos preparados para reaccionar con fuerza y rapidez para limitar la multiplicación del agente infeccioso, mediante unas proteínas llamadas *anticuerpos* o mediante una *respuesta celular*, como se puede ver en la **figura 1**.

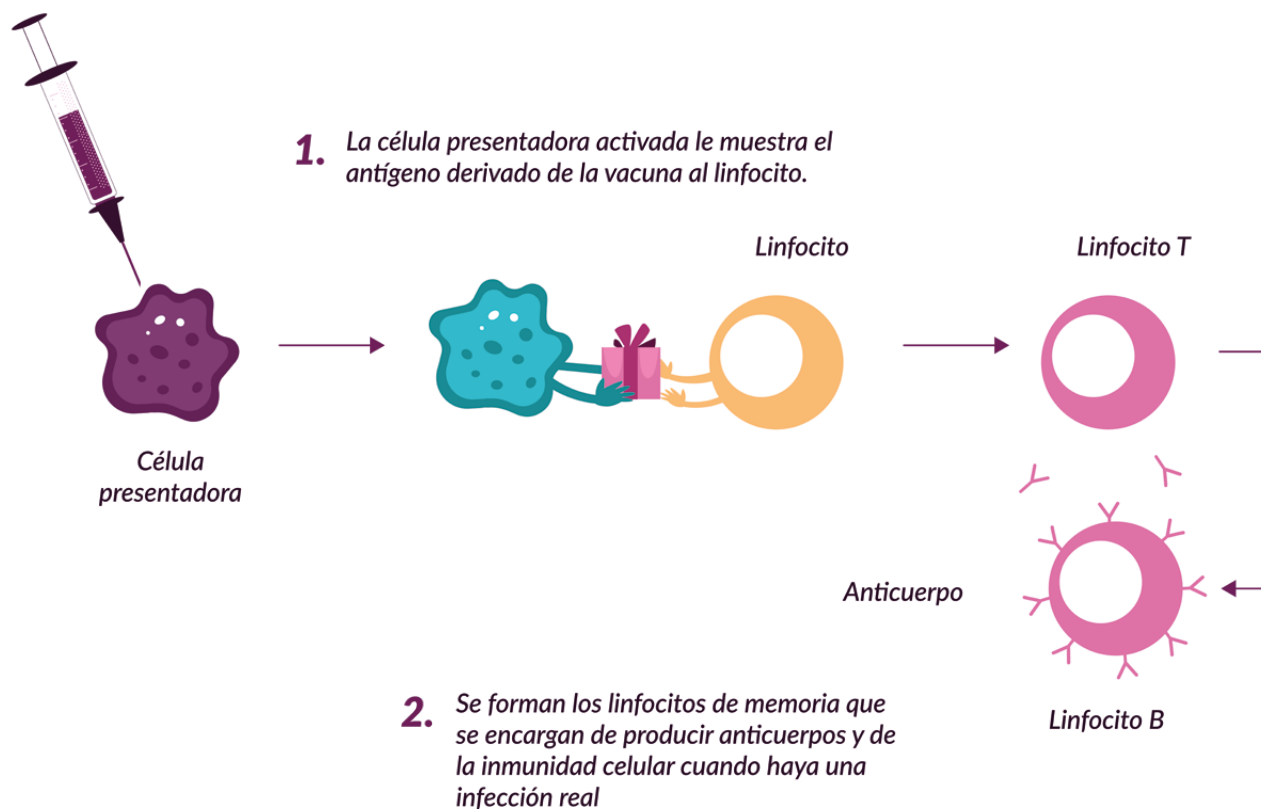


Figura 1. Funcionamiento de una vacuna. Infografía: David Bautista/ Carolina Gomes.

La vacunología ha evolucionado: la nueva generación de vacunas trata de usar solo un antígeno, una parte del patógeno que tenga capacidad de generar un estímulo relevante para el sistema inmunitario y ayude a recordar el germen completo.

Tradicionalmente, las vacunas emplean los patógenos completos atenuados —en los que su capacidad de enfermar ha sido disminuida— o inactivados. Estos patógenos tienen un conjunto de antígenos, sustancias que al entrar al organismo generan una reacción específica por parte del sistema inmunitario. Así, lo que busca una vacuna es que el sistema inmunitario reconozca alguno de ellos de una manera controlada, sin producir todos los síntomas de la enfermedad.

Sin embargo, este tipo de vacunación implica ciertos riesgos para algunas personas con inmunosupresión —aquellas que, por una condición previa o una terapia clínica, tienen sus defensas en un nivel muy bajo—; además, su manufactura a gran escala es bastante complicada. Por ello, la vacunología ha evolucionado: la nueva generación de vacunas

trata de usar solo un antígeno, una parte del patógeno que tenga capacidad de generar un estímulo relevante para el sistema inmunitario y ayude a recordar el germen completo. A estas nuevas vacunas se les denomina *vacunas molecularmente definidas*, que son relativamente más seguras y fáciles de producir a escala industrial.

Desarrollar vacunas: una labor compleja

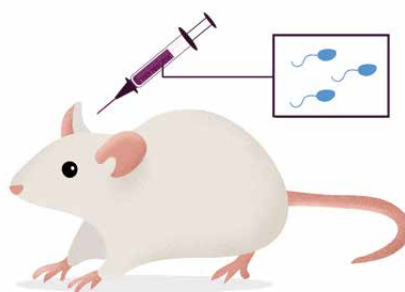
Debido a la situación por la que está atravesando el mundo con la pandemia del nuevo coronavirus, la sociedad ha podido ver de soslayo el complejo proceso de desarrollo de una vacuna. En este momento, hay varias vacunas para la covid-19 que ya están siendo usadas para contrarrestar la pandemia y que pasaron por fases clínicas para evaluar su eficacia —que sí proteja de la enfermedad— y seguridad —que genere lo mínimo posible de efectos adversos—. A esta etapa se llegó después de haber pasado por una serie de fases preclínicas, es decir, antes de los ensayos en seres humanos, las cuales se realizan en cultivos de células en laboratorios de investigación y experimentación con animales no humanos.

Usualmente, el desarrollo de una vacuna toma aproximadamente una década, pero en situaciones de contingencia esto se debe recortar a lo mínimo sin sacrificar el rigor científico y la ética. Por ello, algunas personas podrían preguntarse ¿por qué, si se ha avanzado tan rápido en una vacuna para el virus causante de la pandemia, aún no existen vacunas para muchas otras enfermedades infecciosas?

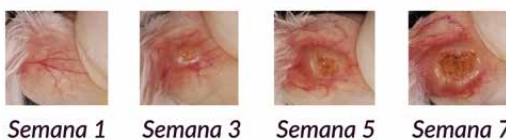
La respuesta se resume en una palabra: complejidad. Por ejemplo, los microorganismos causantes de la malaria o la leishmaniasis son muy grandes, desde un punto de vista genético, lo que se traduce en que pueden expresar muchísimas más moléculas diferentes en su interior —a comparación de un virus—. Además, el ciclo de vida de estos parásitos es intrincado, y han establecido a lo largo de la evolución una relación complicada con los seres humanos, de tal manera que, por

ejemplo, pueden manipular a su conveniencia el sistema inmunitario del organismo que infectan. Todos estos fenómenos hacen que hallar el antígeno, la molécula que permite generar memoria protectora contra estos parásitos, sea una tarea ardua.

En el Grupo Inmunomodulación —GIM— de la Universidad de Antioquia venimos trabajando hace más de una década en la búsqueda de una vacuna para una de estas enfermedades tropicales, la leishmaniasis. Inicialmente, se logró establecer un modelo animal: se simuló en ratones cómo se da el proceso de la infección en humanos, lo que nos ha permitido estudiar algunos aspectos importantes de la infección y buscar estrategias de prevención y tratamiento contra esta enfermedad (**figura 2**).



1. *Los parásitos de Leishmania se inoculan en la oreja del ratón.*



2. *Semana a semana, después de la infección, se revisa el desarrollo de la lesión.*

Figura 2. Modelo experimental para estudiar la leishmaniasis cutánea.
Infografía: David Bautista/ Carolina Gomes

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por un parásito transmitido por la picadura de un insecto. Esta enfermedad está presente en casi toda Colombia y se relaciona con la ruralidad, la pobreza y el conflicto armado. Aunque la presentación cutánea (que es la común en Colombia) no es mortal, sí es dolorosa y causa un gran estigma porque desfigura la piel y las mucosas. Esta enfermedad no tiene vacuna, y el tratamiento es muy deficiente: costoso, tóxico, de difícil acceso, entre otras limitantes.

Usualmente, el desarrollo de una vacuna toma aproximadamente una década, pero en situaciones de contingencia esto se debe recortar a lo mínimo sin sacrificar el rigor científico y la ética. Por ello, algunas personas podrían preguntarse ¿por qué, si se ha avanzado tan rápido en una vacuna para el virus causante de la pandemia, aún no existen vacunas para muchas otras enfermedades infecciosas?

Después de tener el modelo, probamos un sistema vacunal básico, muy eficaz, que consiste en la combinación de la colección de todas las proteínas del parásito –que son sus antígenos– con una sustancia que ayuda a que el sistema inmunitario potencie la respuesta ante dicho antígeno –adyuvante– llamada CpG. También, observamos que una estructura llamada *liposoma*, que puede encapsular los antígenos, aumentaba la eficacia de la vacuna y la protegía del deterioro. Esta historia se publicó en el primer número de la revista Experimenta, en 2014. Sin embargo, estas formulaciones vacunales no eran molecularmente definidas.

Hacia vacunas de nueva generación

Nuestro reto de los últimos años ha sido el desarrollo de una nanovacuna molecularmente definida y gracias a proyectos de investigación financiados por MinCiencias, el Comité para el Desarrollo de la Investigación –CODI– de la UdeA y la Corporación Universitaria Remington hemos avanzado significativamente en el cumplimiento de este objetivo.

Para empezar, debemos tener en cuenta que los parásitos de *Leishmania* tienen alrededor de 8000 proteínas, por lo cual la búsqueda de un pequeño grupo de antígenos definidos que sean candidatos para vacuna se asemeja a buscar una aguja en un pajar. Aunque muchas de estas proteínas pasan desapercibidas por el sistema inmunitario cuando el patógeno nos invade, otras pueden o despertar una respuesta favorable para la resolución adecuada de la enfermedad o, al contrario, despertar una respuesta desfavorable que beneficia la supervivencia del patógeno.

Nuestra idea consistió en determinar cuáles son las proteínas que son detectadas por el sistema inmunitario, lo que denominamos «inmunorreactivas», y de estas, cuáles generan una respuesta inmunitaria favorable que podamos aprovechar para formular la vacuna molecularmente definida. Para esta minuciosa búsqueda usamos una aproximación metodológica denominada *inmunoproteómica*, la cual explora la interacción del sistema inmunitario del hospedador y el conjunto de proteínas del patógeno, con el objetivo de establecer cuáles son los antígenos del microorganismo que inducen una reacción específica en el sistema inmunitario del ratón.

Las proteínas del parásito se separan en un gel según su carga eléctrica y tamaño, mediante una técnica llamada electroforesis, y se transfieren a un papel especial. Este conjunto de proteínas de interés, llamado *proteoma*, se pone en contacto con el suero de animales que son inmunes a la infección, ya sea porque se curaron de una primera in-

fección o porque fueron vacunados con nuestro sistema vacunal básico. En el suero de los ratones están presentes los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación o la infección. Después de poner proteínas y sueros en contacto, se revela el *inmunoproteoma* (figura 3), donde podemos evidenciar cuáles proteínas son reconocidas por un tipo específico de anticuerpo que está relacionado con una respuesta inmunitaria protectora y estas se constituyen en nuestras potenciales candidatas para formar parte de una vacuna eficaz.

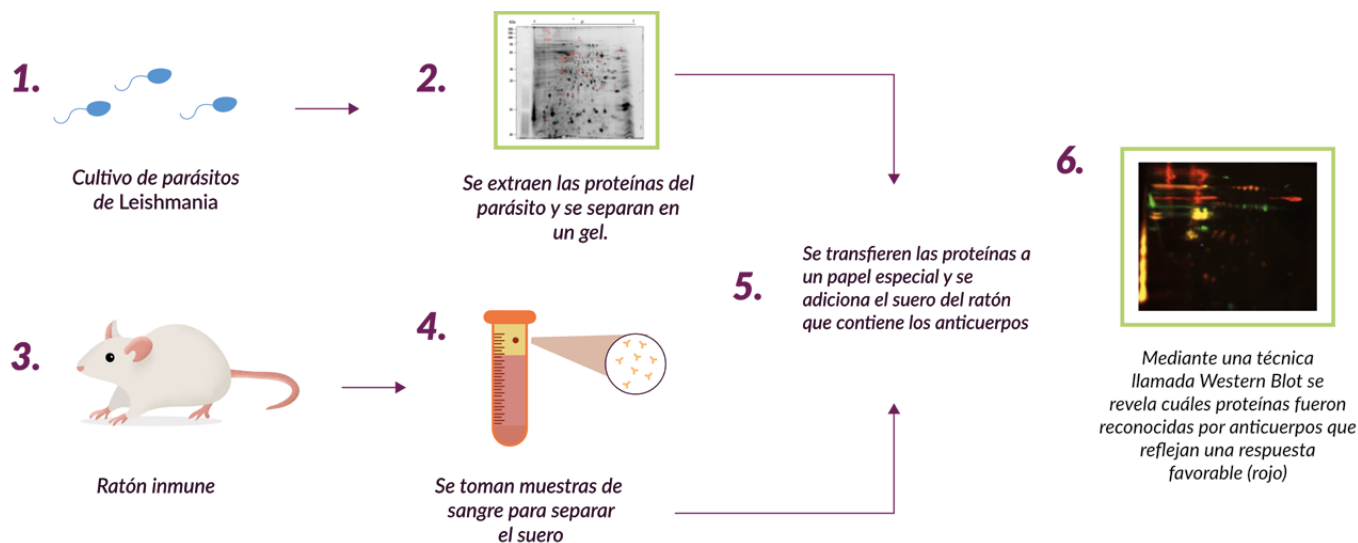


Figura 3. Inmunoproteómica, herramienta para buscar la aguja en el pajar. Infografía: David Bautista/ Carolina Gomes.

Prueba de nuestras candidatas como vacunas de proteínas recombinantes o de ADN

Una vez las proteínas están identificadas con nombre y apellido –conociendo su secuencia y su función en el parásito– pueden obtenerse/formularse de diferentes maneras. Una de ellas es generar una *proteína recombinante*, que funciona como el antígeno de la vacuna. Por otra parte, también se pueden emplear vacunas de ADN, también llamadas vacunas genéticas, las cuales utilizan una pequeña parte de material genético que da la instrucción temporal a las propias células del receptor de la vacuna –en este caso, los ratones– para que produzcan el antígeno deseado. Así pues, decidimos probar ambas metodologías con el objetivo de seleccionar, de un pequeño número de candidatos, el antígeno molecularmente definido más promisorio.

En los experimentos descubrimos que la proteína «TR» era nuestra mejor candidata, pues protegió de manera parcial en el formato de vacuna

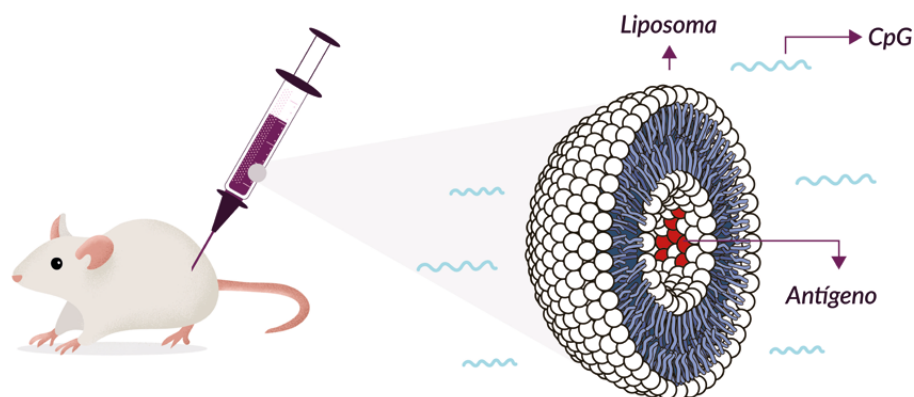
de ADN. Sin embargo, al probarla como proteína recombinante junto con CpG, los resultados fueron poco concluyentes. Antes que rendimos, pensamos que estos resultados se podrían deber a la falta de un vehículo adecuado, pues es sabido que los antígenos molecularmente definidos no despertarán fácilmente la respuesta inmunitaria —es como si fueran invisibles para el organismo, por ser relativamente pequeños, solubles e inestables—. Por tanto, retomamos las formulaciones con liposomas anteriormente mencionadas e hipotetizamos que «encapsular la TR dentro de este sistema particulado mejora la eficacia de la vacuna». Como el sistema inmunitario ha evolucionado para reconocer partículas —por ejemplo, virus o bacterias—, suena razonable la idea de encapsular los componentes de la vacuna en un sistema particulado para ocasionar que el cargamento sea más «llamativo». Ante esto, pensamos «¡esto es precisamente lo que le hace falta a nuestro antígeno!».

Como el sistema inmunitario ha evolucionado para reconocer partículas —por ejemplo, virus o bacterias—, suena razonable la idea de encapsular los componentes de la vacuna en un sistema particulado para ocasionar que el cargamento sea más «llamativo».

Liposomas al rescate

Nuestra proteína seleccionada —TR— fue entonces encapsulada en liposomas y probada en los ratones como vacuna sola o en combinación con el adyuvante CpG, arrojando porcentajes de protección superiores al 80 % en varios experimentos independientes, lo que evidenció que la formulación juega un rol fundamental en la eficacia de las vacunas (**figura 4**). Estos resultados fueron tan prometedores que consideramos que el paso a seguir es confirmar que esta proteína es reconocida por el sistema inmunitario de las personas infectadas con el parásito. De ser así, nuestra vacuna podría producirse bajo estrictas condiciones de manufactura y podríamos iniciar las fases clínicas de desarrollo.

En perspectiva, el futuro de la vacunología se enfocará en las vacunas particuladas y molecularmente definidas: aquellas que se componen de un vehículo de entrega estructurado —como los liposomas— y que además contengan adyuvantes novedosos —como los CpG— y antígenos definidos —proteínas específicas de los patógenos—. Así pues, estos hallazgos evidencian una tarea sistemática de investigación de relevancia y a la vanguardia, que podría acercarnos, finalmente, a tener una vacuna contra la leishmaniasis cutánea para uso en humanos. X



1. Nuestra vacuna compuesta de liposomas que encapsulan el antígeno más CpG soluble se inyecta vía subcutánea

Los ratones se infectan con Leishmania



2. Se observa que los ratones no vacunados se enferman y desarrollan lesiones, mientras que los ratones vacunados no generan lesiones o estas son muy pequeñas

Figura 4. Nuestra nanovacuna molecularmente definida protege a los ratones de la leishmaniasis. Infografía: David Bautista/ Carolina Gomes.

Glosario

Anticuerpos: sustancias solubles que liberan unas células del sistema inmunitario (linfocitos B) y que ayudan a combatir una infección causada por un patógeno.

Respuesta celular: un tipo de respuesta en el que algunas células del sistema inmunitario (linfocitos) se especializan en destruir los patógenos invasores por medio de la liberación de sustancias tóxicas para ellos, y también alertan a otras células para que ayuden a controlar la infección.

Vehículo: en el contexto de las vacunas, un vehículo es una partícula o agregado coloidal que tiene tamaño micro o nanométrico y que encapsula o agrega los otros componentes de la vacuna.

Vacuna molecularmente definida: vacuna compuesta de uno o varios

antígenos de los cuales se conoce específicamente su secuencia o características fisicoquímicas.

Enfermedad tropical desatendida: enfermedad infecciosa frecuente en países o regiones de bajos ingresos, usualmente en el trópico. Se denominan desatendidas porque no llaman mucho la atención de las farmacéuticas y los gobiernos del primer mundo, entonces no existe mucha inversión para investigación científica y médica sobre ellas.

CpG: es una molécula de ADN sintético de una sola cadena corta que activa células del sistema inmunitario, ya que es característica del material genético de virus y bacterias y por lo tanto el sistema inmunitario de los mamíferos la reconoce como una señal de peligro. En la formulación de vacunas, a dosis específicas, esta sustancia funciona como adyuvante para activar el sistema inmunitario.

Liposomas: son pequeñas vesículas de lípidos —moléculas grasas— parecidas a las células; incluso tienen el mismo tipo de membrana, y pueden atrapar los componentes de la vacuna en su interior o en su membrana. Ayudan a proteger el antígeno de la degradación y a potenciar su actividad (es decir, actúan incluso como adyuvantes), y también pueden limitar los efectos negativos de otros componentes de la formulación.

Proteoma y proteómica: el proteoma es el conjunto de proteínas de una muestra. La proteómica es la ciencia que estudia por medio de varias técnicas moleculares las proteínas en una muestra.

Inmunoproteoma e inmunoproteómica: El inmunoproteoma es la relación entre el proteoma y el sistema inmunitario de un organismo. La inmunoproteómica es un conjunto de técnicas que ayudan a estudiar esta relación, con muchos objetivos, entre los cuales se encuentra el descubrimiento de antígenos para formular vacunas.

Proteína recombinante: es una proteína que proviene de un gen que, mediante ingeniería genética, se ha introducido en una célula de una especie distinta a la que originalmente produce la proteína en la naturaleza. Por ejemplo, se puede producir la proteína TR del parásito *Leishmania* en un cultivo de bacterias *E. coli*.

Reconocimientos y agradecimientos:

1. A los miembros actuales y pasados del GIM: Natalia Muñoz, Alexander Gómez, Jelver Sierra, Julián Londoño, Julio Jaramillo, Diana Colorado, Christian Piedrahíta, Cristian Salinas, Esteban Gómez, Lina Orrego, Verónica Guzmán, Paula Correa, Juan Camilo Álvarez, Diana Tabares, Jorge Tabares y Miguel Roldán.
2. A los colaboradores: Tania Creczynski-Pasa (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil), Patricia Cuervo (FioCruz, Río de Janeiro, Brasil), Fanny Guzmán (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile), Ana Mejía, Ómar Triana (Grupo BCEI, Universidad de Antioquia), Juan Alzate y Gisela García (CNSG, Universidad de Antioquia).
3. A los financiadores: Colciencias/MinCiencias, Universidad de Antioquia y Corporación Universitaria Remington.