

Simposio

EL APORTE DE LOS MODELOS ANIMALES A LOS ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE VACUNAS Y AGENTES TERAPÉUTICOS

Modelos animales para el estudio de enfermedades zoonóticas virales

Jorge E. Osorio

University of Wisconsin, Madison, WI, USA

Las zoonosis son enfermedades transmisibles de vertebrados al humano para las cuales mamíferos, aves, reptiles y, probablemente, anfibios actúan como reservorios o huéspedes amplificadores. Las zoonosis virales tienen un alto impacto a nivel mundial y pueden subdividirse en zoonosis virales antiguas (rabia, poxvirus) y en recientes emergentes y reemergentes (hantavirus, SARS, chikungunya, influenza H1N1).

Enfermedades virales zoonóticas ocurren en todos los continentes excepto, tal vez, en La Antártica. Algunas se encuentran alrededor del mundo en una gran variedad de condiciones ecológicas, otras, en focos geográficos y ecológicos bastante limitados. Aunque cientos de virus son zoonóticos, la importancia de muchos de ellos aún no se ha establecido.

Los modelos animales son necesarios para el estudio de las enfermedades zoonóticas virales; también, para el estudio de enfermedades virales que afectan al humano. Estos modelos animales permiten el estudio de la patogénesis y para la

evaluación en la fase preclínica de medicamentos o vacunas que puedan brindar protección.

En esta presentación se discuten brevemente los modelos animales para el estudio de las zoonosis virales. También se presenta el uso de modelos para el desarrollo de medicamentos antivirales y vacunas.

Referencias

1. Hwa SH, Iams KP, Hall JS, Bakke B, Osorio JE. Characterization of recombinant raccoonpox vaccine vectors in chickens. *Avian Dis.* 2010;54:1157-65.
2. Osorio JE, Brewoo J, Silengo SJ, Arguello J, Moldovan IR, Tary-Lehmann M, et al. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:978-87.
3. Osorio JE, Iams KP, Meteyer C, Rocke TE. Visualization of monkeypox pathogenesis by *in vivo* imaging. *PLoS One.* 2009;4:e6592.
4. Partidos CD, Weger J, Brewoo J, Seymour R, Borland EM, Ledermann JP, et al. Probing the attenuation and protective efficacy of a candidate chikungunya virus vaccine in mice with compromised interferon (IFN) signaling vaccine. *Vaccine.* 2011;29:3067-73.



Utilidades y limitaciones del modelo en ratón para la evaluación *in vivo* de medicamentos antipalúdicos

Sara M. Robledo

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina,
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por el parásito denominado *Plasmodium* que se transmite a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. En el organismo humano, los parásitos se multiplican en el hígado y después infectan los glóbulos rojos. El diagnóstico temprano y su tratamiento efectivo y oportuno no sólo reduce la morbilidad sino que, además, previene la muerte asociada a la malaria, pues la infección por *Plasmodium*

spp. altera el aporte de sangre a los órganos vitales.

Entre las intervenciones fundamentales para controlar la malaria se encuentra el tratamiento rápido y eficaz con terapia combinada de derivados de artemisinina para malaria no complicada por *Plasmodium falciparum* o cloroquina combinada con primaquina para los casos de malaria no complicada por *Plasmodium vivax* sensible a la cloroquina. Infortunadamente, en muchas zonas

del mundo los parásitos se han vuelto resistentes a varios de los medicamentos antipalúdicos disponibles. Por lo tanto, es urgente trabajar en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos contra la malaria. El objetivo debe ser desarrollar nuevos fármacos que sean seguros y de fácil acceso para así evitar la propagación de parásitos resistentes a los agentes existentes.

La selección de compuestos candidatos a convertirse en drogas antipalúdicas y que puedan pasar a ensayos clínicos en humanos, se basan en parámetros de eficacia, toxicidad y características farmacológicas de cada compuesto, datos obtenidos a partir de evaluaciones *in vitro* y en modelos animales como ratones y primates no humanos. Teniendo en cuenta que las especies de *Plasmodium* que causan infecciones en humanos son esencialmente incapaces de infectar a los modelos animales no primates —con la excepción del muy complicado modelo de infección por *P. falciparum* en ratones seriamente inmunocomprometidos—, en la evaluación *in vivo* del potencial antipalúdico de compuestos candidatos es muy útil el uso de cepas de *Plasmodium* que infectan roedores, como *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* y *P. vinckei*. Para cada una de éstas, y aun para cepas de una misma especie, se cuenta con información de la duración del ciclo de desarrollo de los parásitos en el roedor, tiempo de esquizogonia, tiempo de sincronización para cada estadio y sensibilidad a varios de los fármacos antipalúdicos.

Particularmente, para la evaluación de la actividad antipalúdica en los modelos de ratón de infección por *Plasmodium* spp. existen varios métodos; los principales son los siguientes:

a) prueba en infección temprana (*suppressive test*) en 4 días, método desarrollado por Peters

(1965) y modificado por Makinde *et al.* (1989) y por Peters y Robinson (1992);

b) La prueba sobre infección establecida (*Rane test*), un método modificado por Ryley y Peters (1970) y

c) la prueba en infección residual (*repository test*), un método basado en el método de Peters (1965).

Cada uno de estos métodos ofrece ventajas para situaciones particulares en las diferentes etapas del descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco.

En esta oportunidad, quiero discutir los diferentes métodos disponibles y resaltar su aplicabilidad al descubrimiento y desarrollo de medicamentos antipalúdicos.

Referencias

1. Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:509-20.
2. Kaira BS, Chawla S, Gupta P, Valecia N. Screening of antimalarial drugs: An overview. *Indian J Pharmacol.* 2006;38:5-12.
3. Makinde JM, Awe SO, Agbedahunsi JM. Effect of *Khaya grandifoliola* extract on *Plasmodium berghei* in mice. *Phytother Res.* 1989;2:30-2.
4. Moreno A, Pérignon JL, Morosan S, Mazier D, Benito A. *Plasmodium falciparum* infected mice: more than a tour de force. *Trends Parasitol.* 2007;23:254-9.
5. Peters W, Robinson BL. The chemotherapy of rodent malaria. XLVII. Studies on puronaridine and other manich base antimalaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992;86:455-65.
6. Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincka and Lips 19481 chloroquine resistance. *Exp Parasitol.* 1965;17:80-9.
7. Ryley JF, Peters W. The antimalaria activity of some quinoline esters. *Ann Trop Med Parasitol.* 1970;64:209-22.



Caracterización biológica de aislamientos de *Leptospira* spp. de pacientes colombianos con síndrome de Weil

Piedad Agudelo-Flórez

Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Colombia

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más extendidas en el mundo debido a que prevalece en zonas tropicales y subtropicales. La infección es producida por especies patógenas del género *Leptospira*, que consiste en un grupo diverso de 20 especies, de las cuales, 13 son patógenas para huéspedes susceptibles, incluyendo al humano. La infección se adquiere

mediante el contacto directo o indirecto de la piel o de las mucosas con la orina de animales infectados ya sean silvestres (roedores, murciélagos) o domésticos (bovinos, equinos, porcinos, caninos).

En el humano, la enfermedad puede ser asintomática o presentarse en sus inicios como una enfermedad parecida a la influenza, en ocasiones con compromiso meníngeo, o asemejarse a

un síndrome febril que puede confundirse con otras enfermedades de zonas endémicas, como el dengue y la malaria. En su forma más común, la leptospirosis se manifiesta como un síndrome febril indiferenciado, anictérico, de comienzo súbito y que no requiere generalmente tratamiento específico. En algunos casos se presentan manifestaciones clínicas serias con ictericia progresiva, manifestaciones hemorrágicas de curso variable e insuficiencia renal, que constituyen la enfermedad de Weil, clásicamente conocida como la forma grave de la enfermedad y potencialmente fatal en 10 a 15 % de los casos. La falla multiorgánica es la consecuencia de una respuesta sistémica a la infección (sepsis). La enfermedad se puede presentar de manera insidiosa con una sintomatología inespecífica previa (comportamiento bifásico) o aparecer súbitamente (curso monofásico).

En los últimos años, la leptospirosis ha aparecido con nuevas manifestaciones clínicas, entre las que se incluye el compromiso pulmonar, característica descrita a partir de la epidemia de Nicaragua en 1995 y, posteriormente, también caracterizada en Suramérica en Brasil, Argentina y Perú. Los síntomas aparecen entre el cuarto y el sexto día de la infección y tiene un curso rápido (72 horas) con altos índices de mortalidad (20 a 50 %), que superan los que se presentan por el clásico síndrome de Weil (10 a 15 %).

A nivel general es escaso el conocimiento sobre el comportamiento de las especies patógenas de *Leptospira* en cuanto a su virulencia y mecanismos patógenos y, menor aún, en cuanto a las características asociadas a la presentación de las manifestaciones emergentes de la leptospirosis. Este conocimiento es básico para la evaluación de los aspectos clínicos de la presentación de la enfermedad, respuesta a los distintos tratamientos y evaluación de vacunas. Para obtener este conocimiento el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) aporta un modelo experimental de susceptibilidad a la infección por *Leptospira* al reproducir las formas graves de leptospirosis.

El propósito de esta conferencia es el de presentar los avances en la caracterización de la dinámica de la infección de aislamientos colombianos de *Leptospira* spp., recuperados de humanos con síndrome de Weil, en el modelo hámster en el que se estudió la dinámica del proceso de infección, por medio de la valoración de los anticuerpos totales por prueba de microaglutinación, patrones hematológicos y alteraciones histopatológicas

en los principales órganos blanco de la infección por leptospirosis, entre los que se cuentan riñón, hígado y pulmón. Todos los experimentos llevados a cabo en los animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia.

Los dos aislamientos de *Leptospira* spp. que fueron caracterizados, se obtuvieron de pacientes antioqueños con sintomatología renal asociada con la presentación de síndrome de Weil. Los cultivos bacterianos se mantuvieron en repiques continuos cada dos semanas durante 6 meses, aproximadamente. Los cultivos se realizaron en medio líquido EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, Becton-Dickinson-Biosciences) con suplemento del 10% de medio de comercial enriquecido (Becton-Dickinson-Biosciences) e incubados entre 26 y 30 °C en condiciones de aerobiosis. Con el propósito de tener un control de la virulencia para fines de comparación de los datos, se usó la cepa de referencia *Leptospira interrogans*, serogrupo Icterohaemorrhagiae, serovar Copenhageni, cepa L1130, donada por la Fundación FIOCRUZ, Brasil.

Se hizo la caracterización molecular de estos aislamientos mediante tipificación molecular de las especies patógenas, según la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos descritos en la literatura. Esta prueba consistió en amplificar el gen *lipL32* que codifica para la lipoproteína del mismo nombre, que es considerado un marcador de capacidad patógena de *Leptospira*. La tipificación molecular de los dos aislamientos de *Leptospira* spp. permitió demostrar su capacidad patógena al ser positiva por PCR *LipL32* y por el análisis de su secuencia que los ubicó en la especie *L. santarosai*, hecho epidemiológicamente importante, porque permite aproximarse a conocer las especies que circulan en nuestro medio y a la caracterización de la enfermedad en Colombia.

Con respecto a la virulencia de los aislamientos colombianos, no se presentó mortalidad en el modelo experimental en hámster por los aislamientos colombianos de *Leptospira* spp., pero sí en los inoculados con la cepa de referencia. No obstante, al hacer el análisis de los resultados de los biomarcadores de química clínica, observamos que a pesar de no presentarse signos evidentes de enfermedad en el grupo inoculado con los aislamientos colombianos, los hallazgos de laboratorio, cinco días después de la infección, mostraron un leve aumento de la proteína C reactiva

con disminución significativa al día 18. En los perfiles hepático y renal se observó variabilidad en los valores, por fuera de los de referencia, sin que hubiera tendencia significativa. Las alteraciones funcionales hepáticas y renales demuestran la capacidad patógena de los aislamientos. La virulencia intermedia de los aislamientos colombianos permite explicar las alteraciones poco acentuadas en las pruebas hematológicas.

Además, en el estudio histológico de cortes de hígado, riñón y pulmón, teñidos con las coloraciones de hematoxilina eosina (para determinar cambios histopatológicos) y Warthin Starry (para establecer la presencia de formas compatibles con *Leptospira* spp.), se evidenció neumonía intersticial, nefritis intersticial y congestión hepática, lo que demuestra la presencia de la bacteria en pulmón, riñón e hígado. Lo anterior fue corroborado por la recuperación de la bacteria en los cultivos de estos órganos.

El conocimiento de estos factores asociados con las dosis letales, virulencia, curso de la infección, tropismo y permanencia de la bacteria en los órganos blanco, permite orientar las estrategias de investigación a futuro sobre inmunoprevención y tratamiento de esta enfermedad por medio de vacunas o agentes terapéuticos. Este conocimiento tiene un valor agregado que está representado por el uso de aislamientos de pacientes colombianos. Si bien se dispone de datos sobre la capacidad patógena y la virulencia de los aislamientos de

Leptospira spp. procedentes de otras regiones geográficas, este conocimiento es innovador para Colombia.

Conclusión

Se reitera que en el territorio colombiano existe circulación de *Leptospira* spp. Patógena, de virulencia intermedia y con capacidad de invadir órganos tales como riñón, hígado y pulmón. Este conocimiento es un aporte a la caracterización de la leptospirosis en Colombia.

Este estudio recibió financiación del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, Colombia (Cod 325645221265 - 352-2008).

Lecturas recomendadas

1. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev. 2009;7:736-47.
2. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005;54:45-9.
3. Silva EF, Santos CS, Athanzio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. Vaccine. 2008;26:3892-6.
4. World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2010. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ilspage.html>.



Hacia la optimización de los ensayos *in vivo* para la validación de compuestos anti-*Leishmania*

Bruno Travi

Department of Internal Medicine-Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

El número creciente de librerías químicas y la automatización de la tamización *in vitro* para la búsqueda de compuestos anti-*Leishmania* utilizando parásitos enteros o blancos parasitarios ha aumentado la capacidad de identificar moléculas líderes. Además, la transcriptómica, proteómica y metabolómica están comenzando a identificar vías de señalización o metabólicas como futuros blancos terapéuticos. El modesto avance de los ensayos *in vivo* lo aportan los parásitos transfectados por episomas o integrados genómicamente con genes reporteros como el gen de la luciferasa y las proteínas verde fluorescente y roja fluorescente.

Empleamos *Leishmania major* y *Leishmania donovani* transfectadas por episomas con el gen

de la luciferasa para las evaluaciones *in vivo* de compuestos con actividad anti-*Leishmania*. Por lo prolongado de los ensayos que miden la curación clínica, hemos adoptado como primer paso la evaluación parasitológica a corto plazo. Los ratones se infectan intradérmicamente (*L. major*) y los hámsteres por vía intracardiaca (*L. donovani*).

El tratamiento con el compuesto líder se aplica tópicamente diariamente a partir del tercer día después de la infección (*L. major*) durante 10 días o por 5 días parenteralmente (*L. donovani*). La carga parasitaria de *L. major* se evalúa *in vivo* (IVIS, Caliper Life Science) en el sitio de la inoculación antes y después del tratamiento, mientras que en

L. donovani sólo se hace al finalizar la terapia en homogenizados de hígado y bazo.

Los compuestos que muestran inhibición parasitaria significativa con respecto a los controles luego se evalúan clínica y parasitológicamente. Entre los compuestos activos se han identificado aminoquinolinas, nitroacridinas y disulfiram, todos ellos en evaluación preclínica parasitológica.

Estos estudios luego deben complementarse con evaluaciones de farmacocinética y farmacodinámica.

En conclusión, los genes reporteros permiten visualizar la cinética de las cargas parasitarias *in vivo* y representan el aporte más valioso a los dichos estudios.

