

Innovación biotecnológica aplicada a “One Health”: Inmunestimulación e Inmunoterapia frente a un patógeno intracelular.

Biotechnology innovation applied to "One Health": Immunostimulation and Immunotherapy against an intracellular pathogen.

Autores: Alberto Tamayo Canelada[†] & Eva Serrano Rodríguez[†]

[†] Ambos autores han contribuido por igual

Grado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UCM

altamayo@ucm.es; evaserra@ucm.es

Tutor: Fco Javier Carrión Herrero

Grupo InMiVet. Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria UCM

javier.carrion@ucm.es

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una zoonosis parasitaria que constituye un problema de “One Health”, ya que afecta tanto a salud pública como veterinaria. Más de 20 especies de protozoos intracelulares pertenecientes al género *Leishmania*, son responsables del mayor número de muertes por enfermedad parasitaria, después de la malaria. En la actualidad ya no se trata de una enfermedad ligada exclusivamente a la pobreza, y se estima que cerca de 350 millones de personas están en riesgo en todo el mundo, con una prevalencia de 12 millones de personas infectadas y una incidencia de 1,3 millones de casos (Alvar et al., 2012). No existen vacunas frente a la leishmaniosis humana, los tratamientos con fármacos como la miltefosina o antimoniales no son del todo eficaces y además tienen efectos secundarios (Gupta, Sane, Shakya, Vishwakarma & Haq, 2011). El desinterés de la industria farmacéutica por desarrollar vacunas y terapias destinadas fundamentalmente a países pobres, ha complicado aún más si cabe la situación. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud ha catalogado a la leishmaniosis como una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes.

En España, la leishmaniosis es endémica y está causada por *Leishmania infantum*, especie parasitaria capaz de establecer la infección tanto en animales como en seres humanos. La transmisión de la enfermedad es de tipo vectorial. Los vertebrados sufren las picaduras de las hembras flebótomo con hábitos hematófagos que sirven de vehículo de transporte parasitario. El perro doméstico es el mayor reservorio de leishmaniosis, no sólo en los países de la zona Mediterránea sino también en otras partes de Europa donde

se ha extendido la enfermedad. De hecho, en muchas regiones de España la leishmaniosis canina representa un importante problema sanitario. En la comunidad de Madrid, la disponibilidad y abundancia de liebres y conejos ha determinado que en estos reservorios alternativos se haya desencadenado un aumento de la virulencia de *L. infantum*, según indica un reciente estudio, capacitando al parásito para infectar no sólo a niños y adultos inmunocomprometidos, como sucedía con anterioridad, sino también a personas inmunocompetentes en general (Dominguez-Bernal et al., 2014). Esto explica que la reciente creación del parque público de Bosque Sur, que alberga una abundancia inusual de estos nuevos reservorios, haya facilitado la aparición de un brote de leishmaniosis humana, todavía activo, en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid que ha afectado a más de 672 personas.

Dado que nos encontramos ante el mayor brote de leishmaniosis humana acontecido hasta la fecha en Europa (Arce et al. 2013), es esencial desarrollar estrategias biotecnológicas innovadoras adaptadas a este patógeno intracelular, que nos permitan optimizar el protocolo de actuación en posibles brotes similares de leishmaniosis. En este contexto, debemos adaptar las herramientas biotecnológicas a las preferencias y características del parásito, capaz de presentarse en dos formas. Así, el ciclo vital parasitario presenta una forma extracelular flagelada (promastigote) que es transportada por el insecto vector, y cuya picadura sobre un hospedador vertebrado liberará dichos promastigotes que nadarán hasta invadir sobre todo sus macrófagos, dentro de los cuales se transformarán en la forma intracelular no flagelada (amastigote), capaz de multiplicarse, romper el macrófago e infectar otros adyacentes para posibilitar su diseminación visceral por el organismo. Los signos de la leishmaniosis visceral, pueden presentarse, incluso de forma simultánea, los de tipo cutáneo (alopecias y ulceraciones) en los puntos de picadura del insecto, y también los de tipo visceral (hepatosplenomegalia y glomerulonefritis), que si no se tratan a tiempo pueden ser letales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parásitos y macrófagos. Los parásitos de *L. infantum* utilizados pertenecen a la cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1, aislada de un perro con leishmaniosis. En todos los casos, los promastigotes fueron cultivados a 26°C en medio Schneider. Dado que el perro es el reservorio más importante de la enfermedad, se ha empleado la línea de

macrófagos canina DH82, adquirida de America Type Culture Collection (ATCC CRL-10389), mantenida en medio completo DMEM a 37°C en incubador de CO₂. Los cultivos se revisaron a diario mediante microscopio invertido y el medio de cultivo se cambió cada 48 a 72 horas. En ensayos previos se determinó que la fase estacionaria parasitaria (cuando son más infectivos) se alcanzaba entre el séptimo y octavo día después del inicio del cultivo.

Obtención de Antígeno Soluble de *Leishmania* (SLA, de las siglas en inglés), motivos CpG, y miltefosina. A partir de cultivos parasitarios, que se sometieron a centrifugación, se siguió un método de choque térmico y sonicación que permitió la liberación del antígeno soluble SLA, para ser utilizado como candidato inmuno-estimulador e inmuno-terapéutico en las correspondientes pruebas realizadas. Previamente fue cuantificado mediante el método Bradford. Los motivos CpG son moléculas sintéticas de ADN no metilado que imitan el ADN bacteriano y que contienen los di-nucleótidos citosina-guanina, siendo poderosos potenciadores del sistema inmunitario (Chu, Targoni, Krieg, Lehmann, & Harding, 1997). Se emplearon motivos CpG ODN 1826 (InvivoGen). La miltefosina se utilizó como fármaco control positivo-standard de actividad antileishmanial (Sigma).

Desarrollo de una estrategia inmuno-estimuladora frente a la infección por *L. infantum*. Se sembraron macrófagos DH82 (5×10^4 células por pocillo) en placas LabTek (Thermo Scientific) y se dejaron durante 18h en presencia o ausencia de los correspondientes estímulos: medio sólo, motivos CpG (20ug/ml), SLA (10ug/ml), SLA+CpG. Al día siguiente se realizó la infección *in vitro*, añadiendo los promastigotes estacionarios de *L. infantum* a una proporción de 10 parásitos por cada macrófago. Después de 1h de infección, aquellos promastigotes que no habían sido capaces de invadir los macrófagos fueron lavados y el cultivo se mantuvo en incubación 24h en presencia de linfocitos caninos. Para ello, se añadieron los linfocitos (a una proporción de 5 linfocitos por cada macrófago) con el fin de reproducir el contexto inmunológico del hospedador. Los linfocitos habían sido previamente obtenidos por el personal del laboratorio InMiVet-UCM a partir de una muestra de sangre periférica de un perro facilitado por el Hospital Clínico Veterinario de la UCM. Finalmente, a las 24 h, las preparaciones son fijadas, teñidas con Giemsa y montadas para su observación microscópica. Así, se calculó el porcentaje de células infectadas y la intensidad de infección (nº amastigotes por célula infectada). De la multiplicación de ambos parámetros se obtuvo el índice de infección (INF).

Desarrollo de una estrategia inmuno-terapéutica frente a la infección por *L. infantum*. Los cultivos de macrófagos DH82 y su posterior infección se realizaron como se ha mencionado anteriormente. Después del lavado de parásitos no internalizados se añadieron los distintos tratamientos: MF (miltefosina), SLACpG y MF+SLACpG. Y se mantuvieron en incubación durante 72h para evaluar el efecto sobre los amastigotes intracelulares. Finalmente, después de los correspondientes periodos de incubación, las preparaciones se procesaron como se ha mencionado con anterioridad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se muestra en la figura 1A, la inmunoestimulación de los macrófagos con SLA+CpG favoreció una sinergia capaz de mejorar significativamente el INF (SLA+CpG: $26,9 \pm 7,6$ frente a la ausencia de estímulo-control: $102,8 \pm 4,9$) de los estímulos por separado.

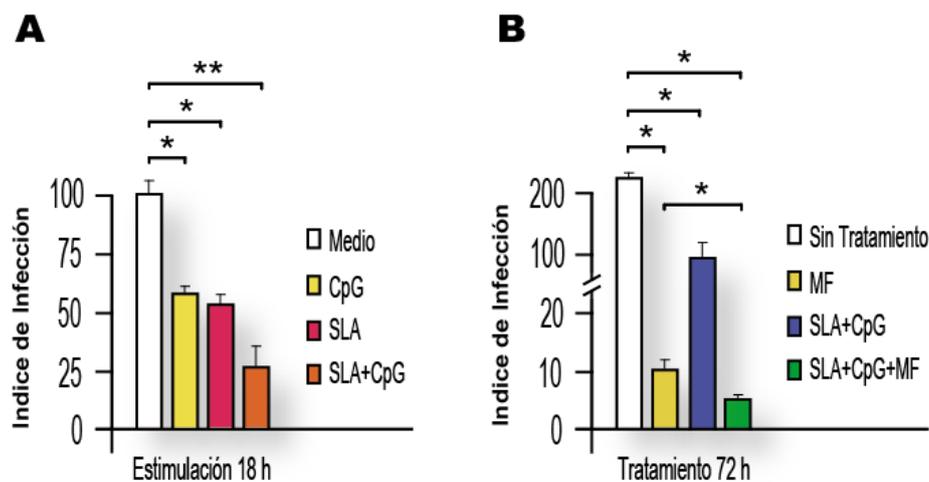


Figura 1. Índices de infección (unidades arbitrarias) obtenidos con la estrategia inmuno-estimuladora (A) o después de 72h con la estrategia inmuno-terapéutica (B). Se muestran las medias y desviaciones estándar. Después de confirmar la distribución normal de los datos, se realizaron pruebas t de Student. *P<0,05, **P<0,01 diferencias significativas.

Esto demuestra la utilidad de este modelo *in vitro* para la evaluación de candidatos vacunales en combinación con motivos CpG, haciendo valer la capacidad de estos últimos para modular una respuesta celular proinflamatoria a través de la estimulación de macrófagos y otras estirpes celulares (Chu et al., 1997). Esto despierta un enorme interés

en la lucha frente a patógenos intracelulares como *Leishmania*. Por otro lado, la figura 1B, no sólo confirma la eficacia ya descrita de la MF como fármaco antileishmanial (Gupta et al., 2011), sino que además la inmunoterapia combinada suscitó en los macrófagos la adquisición de la mayor capacidad leishmanicida, lo que se tradujo en un valor de INF significativamente más bajo (SLA+CpG+MF valor INF: $5,3\pm 1,3$ frente a MF valor INF: $9,5\pm 3,9$). Los resultados reflejan la utilidad del modelo para evaluar estrategias inmuno-terapéuticas combinadas con MF, con el objeto de aumentar los efectos antiparasitarios y mitigar los efectos citotóxicos de la MF al reducir la concentración potencialmente necesaria de fármaco.

CONCLUSIONES

La consideración en conjunto de ambas herramientas biotecnológicas, muestra un carácter innovador en la optimización de un modelo *in vitro* basado en macrófagos caninos, para la selección de candidatos útiles desde un punto de vista inmuno-estimulador y terapéutico que garanticen la adquisición de rápidas medidas de control adaptadas a brotes similares enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., ... & Iriso, A. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*, 18(30), 20546.
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V., & Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 186(10), 1623-1631.
- Domínguez-Bernal, G., Jiménez, M., Molina, R., Ordóñez-Gutiérrez, L., Martínez-Rodrigo, A., Mas, A., ... & Carrión, J. (2014). Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasites & vectors*, 7(1), 499.
- Gupta, S., Sane, S. A., Shakya, N., Vishwakarma, P., & Haq, W. (2011). CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine, a potential combination for treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3461-3464.