

RESEÑA

Obtención y caracterización de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139 para identificar ingrediente farmacéutico activo de una vacuna contra el cólera

Lic. Talena Ledón Pérez

Investigadora Auxiliar. Departamento Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

6 de junio de 2013

TRABAJO PRESENTADO EN OPCION AL GRADO CIENTIFICO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

El cólera es una enfermedad diarreica aguda que provoca deshidratación severa rápida en el humano. Un episodio de cólera o la infección asintomática inducen protección inmunológica duradera por lo que la obtención de una vacuna eficaz y barata contra el cólera constituye un objetivo razonable. Esta enfermedad es causada por la actividad de la toxina colérica producida durante la infección intestinal del humano por la bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae*. Entre más de 200 serogrupos de *V. cholerae* identificados, solo los serogrupos O1 y O139 se han asociado a brotes epidémicos de la enfermedad.

V. cholerae O139 es un serogrupo emergente que se aisló por primera vez en la India a finales de 1992. Se acepta que *V. cholerae* de serogrupo O139 constituya el agente causal de la octava pandemia de cólera. No existe protección cruzada entre los dos serogrupos epidémicos de *V. cholerae* por lo que una vacuna sero-específica es necesaria y aunque existen dos vacunas comerciales 60 % eficaces contra el serogrupo O1, no existe ninguna con eficacia probada contra el cólera causado por vibriones del serogrupo O139.

La vacunación contra el cólera se aborda mediante dos enfoques fundamentales: las vacunas orales de vibriones inactivados y las de vibriones vivos atenuados. Las variantes de células muertas son seguras, fáciles de administrar e inductoras de eventos adversos mínimos, pero precisan de dos o tres dosis, lo que limita su uso en situaciones epidémicas. Las vacunas de microorganismos vivos tienen la ventaja de que la administración de una única dosis podría proveer una protección inmunológica duradera, dada la similitud con el proceso de infección natural. Hasta el momento, no existe ninguna vacuna viva licenciada que proteja contra la infección por *V. cholerae* O139. Por esta razón, resulta razonable trabajar en el desarrollo de una vacuna de vibriones vivos del serogrupo O139 que sea eficaz tras administrar una sola dosis. Sin embargo, el reto de este tipo de vacunas es alcanzar un equilibrio entre la inmunogenicidad y la reactogenicidad.

La toxina del cólera es codificada por los genes *ctxAB*, los cuales residen en el genoma de un profago filamentoso denominado CTXφ. Considerando el papel crucial de la toxina colérica (CT) en el progreso de la enfermedad, el desarrollo de cepas vivas atenuadas ha estado caracterizado por la obtención de candidatos vacunales que carecen del genoma de CTXφ. Este fago puede transmitir los genes de la CT entre cepas de *V. cholerae* que expresen su receptor, la fimbria tipo 4 denominada pilus corregulado con la toxina (TCP) y ese es un mecanismo a través del cual las cepas atenuadas podrían readquirir los genes tóxicos. Sin embargo, se ha descrito que el TCP, el cual se expresa solamente en el intestino es, además, el principal factor de colonización de la bacteria, por lo que en las vacunas vivas atenuadas no se puede prescindir de esta fimbria, aunque las posibilidades de reversión a la virulencia por este mecanismo quedarían limitadas al entorno intestinal. Los genes de CTXφ también pueden adquirirse por un mecanismo eficiente e independiente de TCP consistente en la transducción especializada mediante un fago híbrido entre CTXφ y el vibriofago VGJφ, otro fago filamentoso que utiliza como receptor a la fimbria hemaglutinina sensible a manosa (MSHA).

En este estudio, se obtuvieron, con fines vacunales, dos cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* del serogrupo O139 derivadas de la cepa CRC266, denominadas TLP01 y TLP05. Estas cepas, además de carecer de los genes del profago CTXφ, no producen la fimbria MSHA. La mutación en el gen *mshA*, que codifica la subunidad principal de esa fimbria, estuvo dirigida a mejorar las propiedades de bioseguridad de los candidatos vacunales, al reducir la posibilidad readquisición de genes tóxicos mediante fagos híbridos como CTXφ-VGJφ y otros similares que utilizan la MSHA como portal de entrada a la bacteria. La supresión de este gen no deberá afectar el desempeño vacunal, pues los vibriones no requieren la MSHA para colonizar el intestino, ni esta fimbria participa en la inducción de una respuesta inmune protectora. Por otra parte, para facilitar su identificación en el ambiente, estas cepas fueron marcadas mediante la inserción del gen *celA* de *Clostridium thermocellum* en el locus del gen *hapA*, lo cual a la vez inactiva la producción de la Hemaglutinina proteasa, principal proteasa soluble de *V. cholerae*.

La cepa parental CRC266 se seleccionó sobre la base de que es susceptible a los antibióticos sulfametoxazol, trimetoprima, estreptomina y cloranfenicol. Los genes que confieren resistencia a estos antibióticos, están contenidos en el transposón conjugativo autotransmisible SXT. Esta característica resulta conveniente para un candidato vacunal vivo, ya que una vez liberado al ambiente, no contribuirá a la diseminación en el entorno de los genes de resistencia a antibióticos. Esta cepa, además, coloniza y produce efecto letal en el modelo de ratón neonato. El criterio definitivo de selección se encontró al confirmar, mediante la técnica de Southern blotting, la ausencia de secuencias homólogas a la del vibriofago VGJφ y otros fagos relacionados, indicativo de que no está infectada por estos fagos.

Se investigó la estructura y organización genética de CTXφ en CRC266 para definir posteriormente la estrategia a seguir para su atenuación. El número de copias de CTXφ y su distribución en esta cepa se determinó por el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante análisis por hibridación de ácidos nucleicos de tipo Southern blotting. Se utilizaron sondas específicas que reconocen diferentes regiones del profago CTXφ. A partir del tamaño, número e intensidad de estas bandas se demostró que en el sitio *dif1* de CRC266, se localiza un arreglo de profagos organizados en tándem en el que

coexisten dos copias intactas de CTX ϕ , de las variantes El Tor y Calcuta con tres copias de posibles precursores de CTX ϕ (pre-CTX ϕ), que carecen de los genes de la toxina colérica, precedidos por una copia del profago RS1 ϕ .

El análisis de la secuencia de las formas atoxigénicas presentes en CRC266 confirmó que estas corresponden a formas precursoras de CTX ϕ . Por otra parte, en el análisis por Southern blotting se identificó por primera vez el patrón de restricción característico de los fagos tipo El Tor y Calcuta, a nivel de precursores. Este es un aspecto novedoso, ya que por primera vez, se extiende la diversidad alélica descrita en CTX ϕ a sus precursores. En este sentido, se propone un nuevo modelo explicativo de la posible relación evolutiva entre CTX ϕ y sus precursores, según el cual a partir de un ancestro común pre-CTX ϕ tuvo lugar la diversificación en los tipos alélicos existentes y posteriormente, las diferentes variantes precursoras han adquirido independientemente los genes de la toxina del cólera, para dar lugar a las variantes toxigénicas actuales. Este replanteamiento difiere de la idea propuesta por Boyd y cols. en 2000, los cuales plantearon que una forma precursora común adquirió casuísticamente, el operón *ctxAB*. A partir de la publicación de estos resultados, la diversidad alélica a nivel de precursores ha sido confirmada por otros estudios en los que se han incluido más de 100 cepas de *V. cholerae* de ambos serogrupos epidémicos.

La estrategia concebida consistió en la obtención, a partir de CRC266, de tres generaciones de cepas atenuadas. Una primera generación que se obtuvo a partir de la remoción completa de los genes de CTX ϕ , luego, a partir de uno de los clones obtenidos, se obtuvo una segunda generación de cepas en las que se insertó el *celA* de *Clostridium thermocellum* en el locus del gen *hapA*, con el objetivo de marcarlas y eliminar la producción de la hemaglutinina proteasa y por último, se obtuvo una tercera generación en la que se introdujo una mutación de supresión en el gen *mshA*. Este gen codifica la subunidad principal de la fimbria MSHA, receptor de VGJ ϕ y de otros fagos filamentosos. Todas las modificaciones genéticas se realizaron mediante la técnica de remplazamiento alélico con plasmidios suicidas. En este caso, se emplearon variantes recombinantes derivadas del plasmidio suicida pCVD442. Este método permite lograr la atenuación por eliminación de grandes fragmentos de ADN, lo cual descarta la posibilidad de reversión por variaciones genéticas puntuales. La identificación de la estructura genética de los diferentes clones obtenidos, se realizó mediante la técnica de Southern blotting y se emplearon endonucleasas de restricción que permitieran la identificación inequívoca de los clones correctos. En cada caso, se emplearon sondas marcadas con digoxigenina que reconocen específicamente las regiones involucradas en los procesos de mutagénesis dirigida. De esta forma, se obtuvieron los mutantes de tercera generación TLP01, TLP03 y TLP05 que carecen de los genes de CTX ϕ , portan alelos mutados de *hapA* y *mshA* y poseen, además, actividad celulolítica.

Todas las cepas genéticamente modificadas se estudiaron en ratones Balb/c neonatos para medir el grado de atenuación y la capacidad de colonización, antes de ser evaluadas en humanos. Los clones TLP01, TLP03 y TLP05 resultaron significativamente atenuados respecto a su parental CRC266 (Log Rank, $p < 0,0001$). La infección con 10^8 unidades formadoras de colonias de CRC266 produjo efecto letal en el 86 % de los animales, mientras que todos los animales inoculados con las cepas genéticamente modificadas sobrevivieron. Todas las cepas, en cambio, mantuvieron la capacidad de colonizar el intestino de estos ratones.

Dada la ausencia de secuencias de CTX ϕ en las cepas construidas en este trabajo, estas pueden ser susceptibles a la infección con dicho fago. Se realizó un experimento de infección en el que las cepas se crecieron en condiciones que permiten la expresión de la fimbria TCP, receptora de CTX ϕ y se empleó una variante del fago marcada con kanamicina. En este experimento, se encontró que las cepas atoxigénicas obtenidas a partir de CRC266 no se infectan *in vitro* por el fago CTX ϕ . Sin embargo, los mutantes $\Delta mshA$ son capaces de infectarse con este fago en el intestino del ratón lactante; luego las posibilidades de readquisición de los genes de CT quedarían limitadas, fundamentalmente, al ambiente intestinal humano y dependería de la co-infección del individuo con la cepa vacunal y una cepa toxigénica, dada la restricción a condiciones específicas de crecimiento a que está sujeta la expresión de TCP.

La fimbria MSHA, en cambio, es probablemente un receptor más disponible que TCP en el entorno acuático. Por tanto, un fago híbrido, similar a CTX ϕ -VGJ ϕ , podría tener ventajas sobre CTX ϕ para transmitir los genes que codifican la toxina del cólera bajo condiciones como las encontradas en el ambiente. En este sentido, la obtención de cepas vacunales como TLP01 y TLP05, incapaces de producir MSHA, las prevendría de la infección con fagos portadores de genes tóxicos y reduciría la probabilidad de readquisición de estos genes, sobre todo fuera del intestino humano.

TLP01 y TLP05, además, no forman biopelículas *in vitro* cuando se crecen en medio rico, en condiciones en las que sus parentales sí las producen. Las bacterias en los ambientes acuáticos se encuentran fundamentalmente en asociación con las superficies y se ha postulado que la formación de biopelículas es indispensable para alcanzar naturalmente el estado viable no cultivable. En tal sentido, la incapacidad para producir biopelículas, de manifestarse en el ambiente acuático, podría ser perjudicial para la supervivencia y persistencia de las cepas vacunales en escenarios naturales, colocándolas en desventaja ante el resto de la microbiota presente en el medio; esta característica contribuiría también a la bioseguridad de la vacuna.

El estudio preclínico de las cepas TLP01 y TLP05, una variante mótil y no mótil, respectivamente, resultó satisfactorio, por cuanto se demostró que la estrategia empleada garantizó una atenuación significativa de la virulencia en el modelo para cólera de ratón infante, sin comprometer la inmunogenicidad, la cual se estudió en dos modelos animales: el conejo y la rata adultos. En el caso del conejo, se empleó la vía de inoculación intraduodenal y en las ratas, la vía oral. En ambos casos, se determinó la respuesta de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano (vibriocidas) que se inducen por la administración mucosal de estas cepas con diferentes modificaciones genéticas. Las cepas TLP01 y TLP05 resultaron inmunogénicas en ambos modelos. Al no existir un modelo animal que reproduzca la enfermedad, nada sustituye la evaluación en voluntarios para determinar el nivel de seguridad alcanzado por determinado candidato vacunal.

La tesis doctoral consta de cuatro capítulos, cada uno de ellos describe después de la introducción los aspectos siguientes: Revisión Bibliográfica, la cual se dedica al desarrollo de las bases del conocimiento actual sobre el problema abordado, se detiene en aspectos importantes del microorganismo, la enfermedad y el tema de vacunas; Materiales y métodos, se describen ampliamente y en detalle las diversas técnicas empleadas para la caracterización genotípica y fenotípica de las cepas de partida y las obtenidas según la estrategia secuencial de modificaciones abordada en la tesis; los resultados igualmente revelan tanto los estudios realizados para seleccionar la cepa toxigénica de partida, la caracterización molecular de los sitios sujetos a modificaciones genéticas, así como la descripción en cada caso de los patrones genéticos que debieron obtenerse luego de la mutagénesis, así como la caracterización fenotípica y la evaluación en modelos animales de la respuesta inmune inducida por las cepas seleccionadas; en la Discusión se realiza un profundo análisis de los principales resultados del trabajo sobre la base de los resultados obtenidos por otros autores y de las implicaciones de cada modificación genética para el desempeño demostrado o esperado de las cepas como ingrediente activo de determinada vacuna. Se discuten y se deslindan los puntos de contacto y diferencias con el trabajo precedente realizado

por el propio grupo, en función de obtener la cepa vacunal VC638 del serogrupo O1. Todos estos aspectos se desarrollan en 115 páginas, en las que se incluyen 292 referencias bibliográficas, 18 tablas y 34 figuras. El 54 % de la bibliografía corresponde al período 2000 a 2012. En la tesis se presentan cuatro publicaciones del autor relacionadas con los resultados incluidos en este trabajo que han sido publicados en la Revista CENIC Ciencias Biológicas, en Acta Microscópica y en las revistas indizadas en la Web del conocimiento Research in Microbiology (2008) y Microbes and Infection (2012). Estos resultados han sido presentados en varios eventos nacionales e internacionales como los Congresos Biotecnología Habana 2006 y 2011 (La Habana, Cuba), el Congreso CNIC 2010 (La Habana, Cuba) y el Congreso de la Sociedad Interamericana de Microscopía CIASEM 2011 (Mérida, México) y forman parte de una patente concedida en Cuba y otros 49 países. Los resultados de esta tesis han sido citados por otros autores en las publicaciones Proceedings of National Academy Science (107), Infection, Genetics and Evolution (2) y Environmental Microbiology Reports (10) del año 2010 y Proceedings of National Academy Science (11) de 2011.

En sentido general, se puede decir que este estudio permite disponer de cepas pertenecientes al serogrupo O139 de *V. cholerae* que han resultado atenuadas e inmunogénicas en animales, lo cual avala la continuidad de su desarrollo farmacéutico y la posterior evaluación preclínica y en estudios con voluntarios. Las cepas descritas en este trabajo son las primeras de *V. cholerae* O139 en las que la mutación *mshA* se emplea con el objetivo de mejorar la bioseguridad de una vacuna y las características fenotípicas identificadas presuponen ventajas potenciales de seguridad tanto para los vacunados como para el ambiente.