

Biomodelos preclínicos para vacunas contra *Vibrio cholerae*/ Preclinical biomodels for *Vibrio cholerae* vaccines

Con respecto a los artículos publicados en la revista Vaccimonitor en el volumen 17 número 1 del año 2008 y en el volumen 23 número 3 del 2014 y en los que se describen la aplicación, utilidad y desarrollo de diferentes biomodelos para realizar investigaciones encaminadas a obtener candidatos vacunales contra el cólera humano, quisiera profundizar sobre algunos de los tópicos abordados, lo que pudiera contribuir a una mejor comprensión de los biomodelos usados y evaluar adecuadamente su alcance y limitaciones.

Desde el descubrimiento del agente etiológico del cólera se realizan múltiples intentos para desarrollar biomodelos que permitan estudiar las interacciones entre *V. cholerae* y su hospedero humano. Hasta el momento ningún modelo animal reproduce todos los síntomas y signos de la enfermedad de forma natural.

La utilización de biomodelos en las fases de investigación básica y preclínicas son indispensables para evaluar la virulencia de las cepas de *V. cholerae*, su capacidad de colonizar y de adherirse a la mucosa intestinal, así como la inducción de respuesta inmune en las cepas candidatas a vacunas vivas atenuadas o inactivadas contra el cólera.

Con el uso de diferentes biomodelos, es posible seleccionar cepas como candidatas a vacunas humanas contra el cólera, al reconocer la factibilidad de los mismos en el cumplimiento de los objetivos trazados.

V. cholerae solo puede colonizar exitosamente el intestino delgado de animales lactantes con pocos días de nacidos (1, 2). Esta es la razón fundamental para que los estudios de virulencia y colonización se realicen en ratones o conejos neonatos.

El biomodelo del ratón neonato se utiliza para evaluar la virulencia y la capacidad de colonizar la mucosa intestinal de cepas atenuadas de *V. cholerae*; presenta una aceptable precisión y es capaz de diferenciar cepas con diferente capacidad de atenuación y colonización (3).

I would like to deepen on some of the topics discussed regarding the articles published in the journal Vaccimonitor in the Volume 17 Number 1 of 2008, and the volume 23 number 3 of 2014. They describe the application, use and development of different biomodels for researches, aimed at obtaining vaccine candidates against human cholera, which could contribute to a better understanding of the biomodels used and properly evaluate its scope and limitations.

Multiple attempts are made since the discovery of the etiological agent of cholera to develop biomodels for the study of the interactions between *V. cholerae* and its human host. So far, no animal model reproduces all the symptoms and signs of the disease naturally.

The use of biomodels in basic and preclinical stages of research are essential to evaluate the virulence of *V. cholerae* strains, their ability to colonize and adhere to the intestinal mucosa and the induction of immune response in the strains candidate to live attenuated or inactivated vaccines against cholera.

Using different biomodels is possible to select strains as candidates for human vaccines against cholera, recognizing the feasibility of these in meeting the objectives set. *V. cholerae* can only successfully colonize the small intestine of animals with few days of birth (1, 2). This is the fundamental reason for which the virulence and colonization studies were performed in mice or newborn rabbits.

The neonatal mouse biomodel is used to evaluate virulence and the ability to colonize the intestinal mucosa of attenuated strains of *V. cholerae*; it presents an acceptable precision and is able to differentiate strains with different attenuation capacity and colonization (3).

En el caso de la infección del cólera, se conocen múltiples biomodelos experimentales en la simulación de los procesos clínico-patológicos que causa este microorganismo, siendo muy importante, en este sentido, su utilidad en la demostración de los efectos terapéuticos de las vacunas y sueros, como sucede con el modelo del ratón neonato (1, 3, 4). No obstante, se impone la necesidad de optimizarlos para de esta manera acercarse a los biomodelos “ideales”.

Aunque no existe un biomodelo animal capaz de reproducir todos los síntomas de la enfermedad, muchos de ellos se utilizan para estudiar diversos aspectos de la patogenia e inmunogenicidad de *V. cholerae* (5, 6). Uno de ellos es el modelo del ratón neonato, el cual demostró resultados satisfactorios en la evaluación de la virulencia, mediante la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de las cepas de *V. cholerae* (3).

En humanos, la reactogenicidad de cepas vivas atenuadas se correlaciona con diferentes niveles de colonización intestinal en un proceso complejo y multifactorial. Esto hace que el aumento significativo del valor de la DL₅₀ no se considere un criterio predictivo absoluto de la seguridad. No obstante, se conoce que el incremento entre 3 y 4 órdenes de magnitud correlaciona posteriormente con bajos niveles de reactogenicidad (7).

La adherencia, al igual que la colonización es un factor determinante en la patogénesis del cólera. Es por esta razón, que para el diseño de vacunas atenuadas contra el cólera, se le atribuye gran importancia a la determinación del índice de colonización, porque al ser este microorganismo un patógeno no invasivo, la adherencia y colonización son factores determinantes en su inmunogenicidad (3).

En animales con pocos días de nacidos, se logra la infección y colonización efectiva de *V. cholerae*, debido a que sus intestinos no están del todo desarrollados fisiológicamente y que presentan un sistema inmune inmaduro (4). Sin embargo, este modelo tiene la limitación de que no es útil para estudios inmunológicos, porque los ratones y conejos neonatos según crecen, presentan resistencia natural a la infección por los cambios fisiológicos e inmunológicos que ocurren (1, 8).

Multiple experimental biomodels are known in the case of cholera infection, in the simulation of the clinical and pathological processes caused by this organism, being very important in this regard, its use in demonstrating the therapeutic effects of vaccines and serums, as occurs with the model of the neonatal mouse (1, 3, 4). However, the need to optimize them is imposed to this way get close to the "ideal" biomodels.

Although there is no animal biomodel capable of reproducing all the symptoms of the disease, many of them are used to study various aspects of the pathogenesis and immunogenicity of *V. cholerae* (5, 6). One of them is the model of neonatal mouse, which showed satisfactory results in the evaluation of virulence, by the determination of the median lethal dose (LD₅₀) of *V. cholerae* strains (3).

The reactogenicity of live attenuated strains in humans is correlated with different levels of intestinal colonization in a complex and multifactorial process. This makes that the significant increase of the LD₅₀ value is not considered an absolute predictive criterion of safety. However, it is known that the increase between 3 to 4 orders of magnitude subsequently correlates with lower levels of reactogenicity (7).

The adherence as well as the colonization is a determining factor in the pathogenesis of cholera. It is for this reason that for the design of the attenuated vaccines against cholera, great importance is given to the determination of the colonization index, because of this organism is a non-invasive pathogen, the adherence and colonization are determining factors in its immunogenicity (3).

Infection and colonization of *V. cholerae* is effectively achieved in animals with few days of birth, because their intestines are not fully developed physiologically and present an immature immune system (4). However, this model has the limitation that is not useful for immunological studies, because mice and newborn rabbits as they grow, they have natural resistance to infection by physiological and immunological changes that occur (1, 8).

Cuando se pretende desarrollar una nueva vacuna, la respuesta inmune es un aspecto importante a estudiar. Es importante utilizar un biomodelo animal adecuado para su futura extrapolación al humano, pues esta no es posible en aquellos casos en los que no se ha probado la identidad entre la enfermedad del hombre y la del animal experimental.

El uso de estos modelos se restringe a experimentos de colonización de corta duración y a estudios de patogenicidad, por lo que para la evaluación inmunológica de cepas candidatas a vacuna, se ha escogido un modelo de inoculación intraduodenal en conejo adulto (9), donde a través de una sencilla y rápida intervención quirúrgica, se coloca el inóculo bacteriano directamente en el duodeno, evitando la acidez estomacal a la cual es sensible *V. cholerae*. La aplicación de este biomodelo permitió comprobar que los niveles de anticuerpos medidos tanto por ELISA como por la determinación de anticuerpos vibriocidas, son comparables entre cepas atenuadas y virulentas (9).

La utilidad de modelos como: perros, conejos, ratones y ratas, para el desarrollo y evaluación de vacunas vivas orales contra el cólera es limitado, porque los vibrios no colonizan los intestinos de los animales lo suficiente como para inducir una inmunidad local. La vía natural (oral) en estas especies no es la más adecuada, debido a la barrera anatomofisiológica que representa el bajo pH del jugo gástrico.

A pesar del empleo de fármacos antiácidos, no puede garantizarse que la mayor parte de los vibrios lleguen vivos al intestino, colonicen y se adhieran, para garantizar una respuesta local adecuada y protectora. Por esta razón, la inoculación intraduodenal logra evadir esta barrera, garantizando que la mayor parte de los vibrios tengan la posibilidad de colonizar y adherirse a la mucosa intestinal, y que además exista una respuesta inmunológica más adecuada (9). La especie conejo es utilizada para estos estudios con preferencia a otras especies, por presentar su tracto intestinal similitudes con el humano (8). Por otro lado, esta especie resulta más factible desde el punto de vista práctico, en cuanto a las condiciones de tenencia, manejo y costo, que cuando se utilizan animales de otras especies como: perros, cerdos o ratones, a lo que se añade lo engorroso del proceder quirúrgico en estos últimos. Vale la pena aclarar que el proceder descrito no es necesario cuando se evalúan candidatos vacunales con cepas inactivadas o de subunidades.

When trying to develop a new vaccine, the immune response is an important aspect to study. It is important to use an appropriate animal biomodel for its future extrapolation to the human, as this is not possible in those cases where the identity between the disease of the man and that of the experimental animal is not proven.

The use of these models is restricted to short term colonization experiments and to pathogenicity studies, so for the immunological evaluation of vaccine candidate strains. An intraduodenal inoculation model is chosen in an adult rabbit (9) where through in a simple and quick surgical procedure, the bacterial inoculum is placed directly into the duodenum, avoiding heartburn to which *V. cholerae* is sensitive to.

The application of this biomodel allowed verifying that the antibody levels measured both by ELISA and by vibriocidal antibodies determination, are comparable between virulent and attenuated (9) strains.

The usefulness of models such as: dogs, rabbits, mice and rats, for the development and evaluation of live oral cholera vaccines is limited because vibrios do not colonize the intestines of animals enough to induce local immunity.

The natural route (oral) in these species is not the most adequate, due to the anatomophysiological barrier that represents the low pH of the gastric juice. Despite the use of antacid drugs it can not be guaranteed that most of the vibrios arrive alive to the intestine, colonize and adhere, to ensure adequate protective and local response. Therefore, the intraduodenal inoculation evades this barrier, guaranteeing that most of the vibrios have the ability to adhere to and colonize the intestinal mucosa, and there is also a better immune response (9). The rabbit species is used for these studies in preference to other species, for presenting in their intestinal tract similarities with the human one (8).

On the other hand, this species is more feasible from the practical point of view, regarding the conditions of animal keeping, handling and cost, than when animals of other species are used: dogs, pigs or mice, to which is added the cumbersome of the surgical procedure in these latter. It is worth noting that the approach described is not necessary when vaccine candidates with inactivated or subunit strains are evaluated.

La diarrea es la principal reacción adversa en la infección por *V. cholerae* y define la condición de reactividad para una cepa, atenuada o no, administrada por vía oral, tanto en modelos animales como en los ensayos clínicos de seguridad en humanos.

La diarrea por *V. cholerae* fue simulada experimentalmente con el biomodelo RITARD en conejo por Spira et al (10) en 1981 y desarrollado por otros autores más tarde (10). Este se utiliza además para investigar la patología, colonización bacteriana y el volumen de fluido intestinal, así como para demostrar protección frente a reto en animales inmunizados con candidatos vacunales. Por las posibilidades que brinda este biomodelo se utiliza en conjunto con el modelo intraduodenal para evaluar la inmunidad protectora.

Como ejemplo de este modelo se conoce el estudio que se realizó con la cepa atenuada 638 en conejos inmunizados, luego de un reto con una cepa virulenta. Se constató, desde el punto de vista clínico y anatomopatológico, la protección en los animales inmunizados sin la evidencia de síntomas compatibles con la enfermedad, como lo son las diarreas o daños histológicos a nivel intestinal, no ocurriendo así en los animales controles no inmunizados, donde se evidenciaron diarreas similares a la que ocurre en humanos y graves daños en la mucosa intestinal (9).

Igualmente, el modelo de intestino ligado o Ileal Loop en conejos adultos, perros, ratones, entre otros, se utiliza para la evaluación de la toxigenicidad de diferentes candidatos a vacunas contra el cólera humano (6, 9). Además de ser útil para evaluar la capacidad protectora de un candidato vacunal frente a diferentes cepas, así como la del suero de voluntarios inmunizados por vía oral con un candidato vacunal de células vivas atenuadas. Tiene la ventaja de que se puede evaluar más de una réplica por animal, lo cual favorece el análisis estadístico de los resultados y la reducción de la cantidad de animales a evaluar por cepas, cumpliendo así con un principio de las tres "R" ("Reemplazo, Reducción y Refinamiento").

Teniendo en cuenta este último aspecto, se logró por un grupo de investigadores de la Universidad de Oakland, en los Estados Unidos de América, desarrollar un modelo matemático, que permite estudiar aspectos, como: dinámica de colonización, motilidad, dinámica huésped-hospedero y aspectos fisiológicos; predictivo para humanos y que no se limita solo a los estudios para *V. cholerae*, permitiendo el reemplazo de modelos vivos a matemáticos (11).

Diarrhea is the main adverse reaction in *V. cholerae* infection and defines the condition of reactivity for a strain, attenuated or not, administered orally, both in animal models and in safety clinical trials in humans.

The diarrhea caused by *V. cholerae* was simulated experimentally with biomodel RITARD in rabbit by Spira et al (10) in 1981, and developed by other authors later (10). This is also used to investigate the pathology and bacterial colonization of intestinal fluid volume and to show protection before challenge in animals immunized with vaccine candidates. This biomodel is used together with the intraduodenal model to evaluate protective immunity due to the possibilities offered by it.

It is known as an example of this model the study conducted with the attenuated strain 638 in immunized rabbits, after a challenge with a virulent strain. It was determined from the clinical and histopathological point of view, the protection in immunized animals without the evidence of symptoms compatible with the disease, such as diarrhea or histological damage in the intestine, not occurring this way in the unimmunized control animals, where diarrheas similar to that occurring in humans, and severe damage to the intestinal mucosa were evidenced (9).

Similarly, the ligated intestine model or Ileal Loop in adult rabbits, dogs, mice, etc., is used for evaluating the toxigenicity of different human cholera vaccine candidates (6, 9). Besides being useful to evaluate the protective ability of a vaccine candidate against different strains, as well as that of the serum of volunteers immunized orally with a live cell attenuated vaccine candidate. It has the advantage that it can be evaluated more than one replica per animal, which favors the statistical analysis of the results and the reduction of the number of animals to evaluate per strains, complying with a principle of the three "R" ("Replacement, Reduction and Refinement").

Considering this latter aspect, it was achieved by a group of researchers from the University of Oakland, in the United States, to develop a mathematical model that allows studying aspects such as: dynamics of colonization, motility, host-parasite dynamics and physiological aspects; predictive for humans and not limited to studies for *V. cholerae*, allowing the replacement of live mathematical models (11).

En los últimos años, se ha utiliza un modelo en ratón adulto, donde se realiza tanto la inmunización como el desafío por vía nasal/pulmonar; este biomodelo se puede considerar para estudios preclínicos, aunque no simula la vía natural de la infección (12).

Podemos concluir en que se cuenta con una batería de biomodelos eficaces para dar respuesta al desarrollo de vacunas contra el cólera y otras enterobacterias en sus diferentes etapas de desarrollo. Todos los biomodelos antes mencionados tienen su relevancia, algunos más limitados que otros, el arte está en discernir cual usar bajo las mejores condiciones, puesto que sigue faltando el biomodelo "ideal" que reproduzca fielmente los signos, síntomas y patología del cólera humano.

A model has been used in an adult mouse in recent years, where the immunization and the challenge are both performed by nasal / pulmonary route; this biomodel can be considered for clinical studies, though it does not simulate the natural route of infection (12).

We can conclude that we have at our disposal a set of effective biomodels to respond to the development of vaccines against cholera and other enterobacteria in different stages of development. All the above mentioned biomodels have their relevance, some more limited than others. The art is to discern which one to use under the best conditions, since the "ideal" biomodel that faithfully reproduces the signs, symptoms and pathology of human cholera is still lacking.

Referencias/References

1. Pérez JL, García L, Talavera A, Oliva R, Valmaseda T, Año G, et al. Passive protection of serum from volunteers inoculated with attenuated strain 638 of *Vibrio cholerae* O1 in animal models. *Vaccine* 2001;19:376-84.
2. Fu Y, Mekalanos JJ. Infant Rabbit Colonization Competition Assays. *Bio-Protocol* 2014;4(11):e1147. Disponible en: <http://www.bio-protocol.org/e1147>
3. Oliva R, García H, Infante JF, García L, Pérez JL, Cedré B, et al. Biomodelo para la evaluación de cepas atenuadas como candidatos vacunales contra el cólera humano. I. Estudio de la virulencia, capacidad de colonización y adherencia a la mucosa intestinal. *VacchiMonitor* 2008;17(1):1-6.
4. Alam A, Laroque RC, Harris JB, Vanderspurt C, Ryan ET, Qadri F, et al. Hyperinfectivity of human-passage *Vibrio cholerae* can be modeled by growth in the infant mouse. *Infect Immun*. 2005;73(10):6674-9.
5. Ledón T, Ferrán B, Vichi J, Suzarte E, Oliva R, Fando R. Evaluación en modelos animales de cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2010;41(Edición Especial 1):1-12.
6. Sawasvirojwong S, Srimanote P, Chatsudhipong V, Muanprasat C. An Adult Mouse Model of *Vibrio cholerae*-induced Diarrhea for Studying Pathogenesis and Potential Therapy of Cholera. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(6):e2293. doi:10.1371/journal.pntd.0002293.
7. García L, Benitez J. Hacia el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera. *VacchiMonitor* 1996;5(2):2-6.
8. Kondo M, Yamato M, Takagi R, Murakami D, Namiki H, Okano T. Significantly different proliferative potential of oral mucosal epithelial cells between six animal species. *J Biomed Mater Res* 2014;102(6):1829-37.
9. Oliva R, García HM, Infante JF, Pérez JL, Cedré B, Valmaseda T, et al. Biomodelos para la evaluación de cepas atenuadas como candidatos vacunales contra el cólera humano. Estudio de la toxigenicidad, inmunogenicidad y protección. *VacchiMonitor* 2014;23(3):100-9.
10. Spira WM, Sack RB, Froehlich JL. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infect Immun* 1981;32:739-47.
11. Spagnuolo AM, DiRita V, Kirschne D. A model for *Vibrio cholerae* colonization of the human intestine. *Journal of Theoretical Biology* 2011;289:247-58.
12. Kang SS, Yang JS, Kim KW, Yun CH, Holmgren J, Czerkinsky C, et al. Anti-bacterial and anti-toxic immunity induced by a killed whole-cell-cholera toxin B subunit cholera vaccine is essential for protection against lethal bacterial infection in mouse pulmonary cholera model. *Mucosal Immunology* 2013;6(4):826-37.

Reynaldo Oliva-Hernández

Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia/ Doctor of
Veterinary Medicine and Zootechnics.

MSc en Medicina Veterinaria Preventiva/ MSc in
Veterinary Preventive Medicine.

Profesor Asistente/ Assistant Professor.

Jefe del Departamento de Preclínica/ Head of Preclinical
Department.

Dirección de Investigación, Instituto Finlay/ Research
Division, Finlay Institute.

email: roh@finlay.edu.cu; reyolivacuba@gmail.com

La Habana, 23 de Enero de 2015.

Recibido: Diciembre de 2014

Aceptado: Enero de 2015