

Vacunación: la única esperanza para controlar la leishmaniasis

Dr. Farrokh Modabber*

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se conocen más de 20 especies patogénicas de *Leishmania* que producen una variedad de manifestaciones clínicas conocidas colectivamente como leishmaniasis. Los hospedadores reservorios son diferentes para las diversas especies: perros, mamíferos salvajes y humanos. La infección se transmite por mosquitos que pertenecen al género *Lutzomyia* en las Américas (donde generalmente se conoce como leishmaniasis del "Nuevo Mundo") y *Phlebotomus* en otras partes (conocida como leishmaniasis del "Viejo Mundo"). Debido a la diversidad de los hospedadores, vectores y parásitos -que llevan hacia distintas características epidemiológicas- no ha sido posible diseñar una estrategia de control universal aplicable a todos los focos de leishmaniasis.

Las estrategias de control se han enfocado en tres niveles: control de reservorios, control de vectores y auto-protección por medio de educación para la salud (1). El control de reservorios para infecciones antroponóticas (cuando el reservorio es el hombre) requiere de diagnóstico y tratamiento precoces. La prueba diagnóstica clásica está basada en la detección de parásitos, que evidentemente no es bastante sensible y definitivamente no aplicable en amplia escala para diagnóstico precoz.

El tratamiento de la leishmaniasis es costoso y requiere de inyecciones diarias por varias semanas. El control de reservorios es generalmente poco factible para la mayoría de los animales salvajes y requiere infraestructuras que generalmente no puede ser costeadas por muchos países. La eliminación de los perros infectados que son fuente de infección, especialmente cuando poseen una apariencia normal, es imposible en muchas sociedades. El control de vectores mediante insecticidas puede ser dañino para el medio ambiente, requiere aplicación constante e infraestructuras que son difíciles de mantener en la mayor parte de los focos y son factibles sólo cuando se produce transmisión en o alrededor de las viviendas humanas.

Los costos del control de la leishmaniasis han sido muy altos. En los pocos casos de éxito, por ejemplo en China (eliminación de perros sospechosos más diagnóstico y tratamiento precoz) o en algunas zonas de Arabia Saudita (destrucción con arados y envenenamiento de las colonias de *Psammomya*, junto con el rociamiento de insecticidas) y en la India (como resultado de los programas de control de la malaria), la enfermedad ha reincidido por falta de mantenimiento de los programas. La educación para la salud por si misma puede ser efectiva y podría mantenerse en ciertas áreas, pero en ausencia de una herramienta de control poderosa, su efectividad será muy limitada (2).

En la situación actual, parece que la única esperanza de obtener el control de la enfermedad sería a través de una vacuna efectiva y de precio razonable. La meta del programa del TDR (Programa Especial de la Organización Mundial de la Salud para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales) es ayudar a desarrollar una vacuna de precio razonable, producida a bajo costo en países

* Director, Comité Directivo sobre Vacunas para la Leishmaniasis. Coordinador, Investigación Estratégica UNDP/Banco Mundial/ Programa Especial de la Organización Mundial de la Salud para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR). Presentado en la Academia Nacional de Medicina el día 20 de junio de 1996.

endémicos, que pueda ser aplicada junto a un programa de educación de la salud en las comunidades afectadas. ¿Es posible generar una vacuna que proteja contra veinte especies diferentes de leishmania? Espero convencer al lector de que sí es posible. ¿Sería esa vacuna una mezcla de veinte especies diferentes? La respuesta es muy probablemente, no. ¿Cuál es la posibilidad de tener una vacuna para los programas de control de algunos países para fines de este siglo? El éxito dependerá directamente de los recursos asignados; sin embargo, hay muchas posibilidades que se disponga de una vacuna para fines de este siglo.

Recientes avances hacia el desarrollo de una vacuna

Modelos animales

La dicotomía de los linfocitos T- colaboradores fue evidenciada hace seis años. Locksley y col. (3) demostraron claramente que la subpoblación Th1 era protectora y que la Th2 producía exacerbación de la enfermedad. Una pregunta importante fue si el repertorio de receptores de linfocitos T (TCR) estaba restringido con respecto a especificidad para antígenos del parásito en estas dos subpoblaciones. Si era así, entonces ciertos epítopes serían inherentemente inductores de respuestas tipo Th1 y otros inducirían exclusivamente Th2. Se podría haber pensado que tales restricciones no existían, puesto que los ratones BALB/c (propensos a respuestas tipo Th2 después de infección) podrían ser protegidos por inyección intravenosa o intraperitoneal (IV o IP) de parásitos de *Leishmania* completos muertos, mientras que la misma vacuna administrada por vía subcutánea (SC) produciría una respuesta tipo Th2. Sin embargo, el uso de antígenos crudos, los cuales contienen cientos, si no miles, de diferentes epítopes, permite argumentar que el usar diferentes vías de inoculación favorecería la presentación de diferentes entidades antigénicas, de tal forma que las células Th1 inducidas por inyección IV o IP puedan tener diferente especificidad de las células Th2 inducidas por inyección SC.

La observación crucial de Reiner y col. (4) que demostró que ambos tipos de células usan los mismos receptores en los linfocitos T, negó la restricción de repertorio en linfocitos Th1 y Th2.

Estos resultados permitieron advertir que los antígenos seleccionados, al analizar los linfocitos T

de los individuos inmunes, pueden en realidad producir una exacerbación de la respuesta tipo Th2, si se presentan equivocadamente. Sin embargo, sus observaciones implican que epítopes inversos vistos por los linfocitos Th2 podrían inducir una respuesta protectora, si se presenta correctamente. La observación de Reiner, junto con resultados más recientes con el uso de IL-12 como adjuvante en ratones con diferentes antígenos (5), indica que la selección de antígeno para una vacuna contra la leishmaniasis no es tan crucial como se pensó, sino que es más bien la presentación del antígeno lo que es importante. Sin embargo, debe notarse que diversas moléculas presentadas de forma similar, tienden a inducir preferencialmente una respuesta ya sea de tipo Th1 o Th2. Esto se demuestra con el uso de péptidos sintéticos sobrepuestos de gp63. Sin embargo, no se sabe si los péptidos que tienden a producir una respuesta tipo Th2, pueden producir por sí mismos una respuesta tipo Th1 cuando se administran junto con IL-12 (6).

Si la selección de antígenos leishmánicos para una vacuna no es crucial y es posible inducir una respuesta tipo Th1 con cualquier inmunógeno relevante, más el factor co-estimulante (ya sea IL-12 o inductor de IL-12), entonces el enfoque empírico de usar parásitos muertos completos más BCG - promovido en años recientes por el Profesor Convit y col. (7) y que actualmente está en pruebas de campo de eficacia- puede haber sido en realidad un enfoque muy racional hacia el desarrollo de una vacuna. Se han hecho muchos avances en lo que se ha denominado enfoque empírico hacia el desarrollo de una vacuna mediante parásitos de *Leishmania* muertos completos más BCG, durante los últimos tres o cuatro años, según discutiremos más adelante.

Estudios humanos en el Nuevo Mundo

Hay dos grupos altamente activos en el desarrollo de una vacuna en América Latina.

El primer grupo, en el campo de una vacuna profiláctica y de inmunoterapia contra la leishmaniasis está dirigido por el Profesor Convit en Venezuela. Convit y col. (8) han sido pioneros en el uso de parásitos de *Leishmania* muertos más BCG para la inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea. Actualmente se ensaya una combinación de inmunoterapia más quimioterapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Hace poco se inició un gran estudio de vacunación profiláctica con *L.*

mexicana con BCG, *L. mexicana* sin BCG, *L. brasiliensis* con BCG, BCG solo y un control con placebo. Las respuestas inmunes después de vacunación son indicativas de una estimulación tipo TH1. La disminución de la incidencia de leishmaniasis en el área del estudio de vacunación, ha retardado la finalización de este estudio y ahora se espera que los resultados estén listos durante los próximos dos a tres años.

El otro grupo, en Belo Horizonte, dirigido por el Profesor Mayrink (9,10), usa una mezcla de cuatro a cinco diferentes parásitos de leishmania en tres inyecciones separadas por una semana. Han demostrado que esto produce protección, la cual se puede medir en aquellos individuos que convierten su reactividad intradérmica hacia la leishmanina. La vacuna usada en estudios anteriores fue producida en sus laboratorios. Hoy en día, usan una vacuna de una sola especie, preparada por BIOBRAS de acuerdo al procedimiento original de Mayrink (*L. amazonensis*), con métodos correctos de fabricación, adecuados para uso en humanos. Esta vacuna ha sido usada en estudios fase I y II (inocuidad e inmunogenicidad) en voluntarios en Brasil. Se han planificado otros estudios en varios países de Latino América. Se han realizado muchos estudios sobre la inocuidad e inmunogenicidad del enfoque de Mayrink hacia la vacunación y se han estudiado varios parámetros inmunes. Vale la pena hacer notar que esta vacuna produce una respuesta predominantemente de células CD8⁺, el mismo tipo de respuesta que se produce durante la recuperación de la leishmaniasis (11). La asociación de células CD8⁺ con la recuperación de la enfermedad fue demostrada previamente en ratones. Mayrink y col. también han demostrado la utilidad de su vacuna en inmunoterapia mezclándola con BCG, como en Venezuela.

La práctica de la leishmanización (inoculación con microorganismos vivos) se usó antiguamente en forma rutinaria en el Viejo Mundo y se abandonó durante la guerra Irán-Iraq, cuando más de dos millones de individuos fueron infectados durante los años 80. Afortunadamente, esta práctica se ha terminado.

Durante años recientes, el grupo de Irán (12), en colaboración con el TDR, se ha concentrado en la producción de una vacuna de *L. major* muerta más BCG, siguiendo el camino del Profesor Convit y col. La vacuna es producida por el *Razi State Vaccine and Serum Institute*; el BCG y la leishmanina usada

en todos los estudios de campo son producidas por el Pasteur Institute en Teheran (13). Este esquema ha sido desarrollado estrictamente según el protocolo del Profesor Convit, siendo la única variante el ejemplo de parásitos de una cepa de leishmania del Viejo Mundo.

Los estudios Fase I-II se han realizado en voluntarios, paso a paso, con diferentes dosis de *L. major* muerta (KLM) y *L. major* con BCG o sin él, a través de protocolos aleatorios, doble ciego y controlados con placebo. Inicialmente, el parásito se mató con timerosal, pero la suspensión demostró ser inestable. Posteriormente, se produjeron y se probaron parásitos de *L. major* preparados en autoclave (ALM), en forma similar a la vacuna del Profesor Convit. Este preparado demostró ser estable e igualmente reactivo. Bahar y col. (comunicación personal) siguieron las respuestas “*in vitro*” y la conversión de las pruebas intradérmicas de los individuos vacunados. Bahar visitó el Instituto de Biomedicina y coordinó su trabajo con el que se realizaba ahí. Se midieron las respuestas de interferón-gamma (IFN), IL-5 y anticuerpos para diferentes dosis. La inocuidad de una sola inyección ha sido bien documentada y se discutirán las respuestas inmunes. Basándose en la magnitud y duración de las respuestas de IFN e intradérmicas, en ausencia de producción de anticuerpos, se seleccionó una dosis de 1,0 mg de proteína total de ALM más 10⁴ unidades formadoras de colonias de BCG, como vacuna de una sola dosis para los estudios multicéntricos de eficacia que se están realizando actualmente.

Estos estudios se están efectuando contra la leishmaniasis cutánea producida por *L. major*, en población adulta en Pakistán (Abdur Rab y col.), en todas las edades (6-60 años), en ambos sexos y en Isfahan, Irán (Momeni y col.). La misma vacuna se está probando en niños (8-12 años) de ambos sexos en Bam, Irán, contra leishmaniasis cutánea antroponótica producida por *L. tropica* (Sharifi y col.) y contra leishmaniasis visceral en Sudan (Ghalib y col.). Los resultados de estos estudios se presentarán en algún tiempo más.

Hubo varias opciones en el desarrollo de la vacuna muerta más BCG. La seleccionada representa la más simple y costo-efectiva. Si demuestra ser eficaz, la vacuna puede implementarse directamente en programas de control. Los efectos secundarios de la vacuna son únicamente aquellos asociados con el BCG solo, tal como desarrollo de una lesión en el

sitio de vacunación, que cura espontáneamente después de dos a tres semanas; fiebre y ocasionalmente una linfadenopatía auto-limitante. Si la actividad protectora no es lo bastante alta, se puede pensar en diferentes esquemas (vacunación múltiple) u otras dosis o adyuvantes.

En general, la vacuna es bien aceptada. Indudablemente, el reemplazo del BCG por un adyuvante sin efectos secundarios sería ciertamente ventajoso para una vacuna contra la leishmaniasis. Sin embargo, como es el caso con la mayor parte de los focos altamente endémicos de leishmaniasis, una inyección de refuerzo de BCG puede también ser beneficiosa contra la tuberculosis. En todo caso, en comparación con cinco años atrás, se han hecho considerables avances en la realización de estudios clínicos de la eficacia de la vacuna de parásitos muertos de *Leishmania* más BCG. Los resultados de estos estudios estarán disponibles dentro de los próximos dos o tres años.

Las vacunas actualmente en estudios clínicos, a las cuales también se les están estudiando aspectos de estabilización y estandarización del producto final, se consideran como de primera generación. La interrogante importante es si la vacuna de primera generación demuestra ser altamente eficaz para prevenir la leishmaniasis (digamos 80%-90%, ¿sería necesario invertir en una vacuna de segunda generación?

Vacunas de segunda generación

En una reunión realizada en Salvador, Bahia, Brasil, en abril de 1995 (14), se discutieron los avances en el desarrollo de vacunas de segunda generación. Como recientemente se ha publicado un amplio informe de esa reunión, bastará sólo mencionar brevemente las diferentes vacunas candidatas y referir al lector a la excelente revisión de Grimaldi y Tesh (15). Las vacunas de segunda generación, definidas como las que no consisten de parásitos muertos completos más un adyuvante, se pueden dividir en tres categorías generales: vacunas vivas, moléculas recombinantes y otras (fracciones y péptidos sintéticos).

Vacunas vivas

De varias opciones para vacunas vivas, la vacuna de cepas "knockout" de Beverley está siendo probada en primates. Por medio de técnicas de reemplazo de genes, Cruz y col. (16) extrajeron el gen para

dihidrolato reductasa/timidilato sintetasa (DHFR/TS), y produjeron así una cepa auxotrófica de *L. major* que requiere timidina para su crecimiento (DHFR/TS⁻). Se demostró que esta cepa "knockout" de *L. major* era incapaz de producir enfermedad en ratones BALB/c y ratones inmunodeficientes y que la inyección de este microorganismo producía una resistencia importante a un desafío posterior con *L. major* virulenta. Este es un enfoque novedoso hacia el desarrollo de vacunas en general y los leishmaniólogos son una fuente de inspiración para otros investigadores. La inocuidad e inmunogenidad de este parásito están siendo ahora mejor estudiadas en modelos primates.

Si demuestra ser inocua y altamente eficaz en primates, pronto se iniciarán estudios clínicos. El único inconveniente de este enfoque es el mantenimiento de parásitos de *Leishmania* vivos antes de la vacunación, que puede resultar difícil en áreas remotas.

Moléculas recombinantes

Se han probado varias moléculas recombinantes (gp63, LEIF, LACK) en ratones, con éxito variable. Una fracción purificada, dp 70-72, cuyo gen está siendo ahora clonado y expresado, muestra promesa contra diferentes especies de leishmania (17,18).

Péptidos fraccionados y sintéticos

El TDR ha optado no proceder con antígenos fraccionados por razones de simplicidad en caracterización y costo (19).

Han habido varios intentos de vacunación con el uso de fracciones. Mongneau y col. (20) y O'Daly y col. (21), han reportado estudios muy significativos de protección en animales y el TDR apoyó algunos de estos esfuerzos. Ambos grupos han realizado estudios clínicos con sus vacunas, independientemente del TDR.

CONCLUSIÓN

El desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis se ha realizado completamente dentro de un enfoque empírico, con mínimos ingresos financieros en comparación con el desarrollo de vacunas en general. Las vacunas de primera generación (parásitos de leishmania muertos con o sin BCG, iniciadas en Venezuela y Brasil, respectivamente, están en

estudios multicéntricos de eficacia en el campo, o pronto entrarán en esta etapa. Los resultados de algunos de estos estudios estarán disponibles en uno o dos años, pero no es demasiado pronto para pensar en planificar el desarrollo de vacunas mejor definidas de segunda generación contra diferentes formas de leishmaniasis, porque toman varios años antes de estar en la etapa de estudios en humanos.

REFERENCIAS

- 1 WHO Expert Committee Report. Control of the Leishmaniasis TRS 793.1990:51-55.
- 2 Grimaldi G. Meetings on vaccine studies towards the control of leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995;90:553-556.
- 3 Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. Immunol Today 1991;12:A58-61.
- 4 Reiner SL, Wang ZE, Hatma F, et al. TH-1 and TH-2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. Science 1993;259:1457-1460.
- 5 Alfonso LC, Scharon TM, Viera LQ, et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against Leishmania major. Science 1994;263:235-237.
- 6 Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, et al. A recombinant Leishmania antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a TH-1 type cytokine profile and to produce interleukin 12. J Exp Med 1995;181:1527-1537.
- 7 Convit J, Aranzazu N, Ulrich M, et al. Immunotherapy with a mixture of Mycobacterium leprae and BCG in different forms of leprosy and Mitsuda-negative contacts. Int J Leprosy 1982;50:415-424.
- 8 Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, et al. Immunotherapy of localized, intermediate, & diffuse forms of american cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis 1989;160:104-115.
- 9 Mayrink W, Genaro O, Franca-Silva JC, et al. Protection against canine visceral leishmaniasis by using a vaccine composed of killed promastigotes of Leishmania braziliensis. Mem Inst Oswaldo Cruz (Suppl I) 1994;89:179 (Abstract).
- 10 Mayrink W, Magalhaes PA, Michalick MS, et al. Immunotherapy as a treatment of american cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. Parasitología 1992;34:159-165.
- 11 Mendoca SCF, De Luca P, Mayrink W, et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against american tegumentary leishmaniasis. En imprenta: Infection and Immunity.
- 12 Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Ahourai P, et al. Vaccine preparation and quality control of killed Leishmania major. Archive Inst Razi 1993;42/43:39-50.
- 13 Alimohammadian MH, Kivanjah M, Pak F, et al. Evaluation of the efficacy of Iran leishmanian and comparison with leishmanins from Wellcome (UK) and Roma (Italy) in cured cutaneous leishmaniasis patients. Trans R Soc Trop Med Hygiene 1993;87:550-551.
- 14 Modabber F. Vaccines against Leishmaniasis. Am Trop Med Parasitol 1995;89:83-88.
- 15 Grimaldi G, Tesh R.B. Leishmaniasis if the world: Current concepts and implications for future research. Clin Microb Rev 1993;230-250.
- 16 Cruz A, Coburn CM & Beverley SM. Double targeted gene replacement for creating null mutants. Proc Natl Acad Sci (EE.UU.) 1991;88:7170-7174.
- 17 Gueiros-Filho FJ, Beverly SM. On the introduction of genetically modified Leishmania outside the laboratory. Exp Parasitol 1994;78:25-428.
- 18 Titus RG, Gueiros-Filho FJ, De Freitas LAR, et al. Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement. Proc Natl Acad Sci 1995;92:10267-10271.
- 19 Rachamin N, Jaffe CL. Pure protein from Leishmania donovani protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. J Immunol 1993;150:2322-2231.
- 20 Mongneau E, Altare F, Wakil AE, et al. Expression cloning of a protective Leishmania antigen. Science 1995;268:563-566.
- 21 O'Daly JA, Spinetti H, Rodríguez MB, et al. Proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias protegen a seres humanos contra la leishmaniasis en el área endémica de Guatire, Edo. Miranda, Venezuela. Gac Méd Caracas 1995;103(2):133-177.