



Desarrollo de una vacuna contra la Leishmaniasis cutánea en sus aspectos de inmunoterapia y posible aplicación en inmunopprofilaxis

Jacinto Convit¹.

¹Doctor en Ciencias Médicas

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

En este artículo, se mencionan brevemente los trabajos que se han realizado en el Instituto de Biomedicina sobre el desarrollo de una vacuna contra la Leishmaniasis Cutánea Americana. Estos han tenido como base el espectro de manifestaciones clínico-inmunológicas de la enfermedad, así como su posible aplicación en inmunopprofilaxis, mediante el estudio de los posibles mecanismos de acción de la mezcla de promastigotes de Leishmania muertos más Bacilos de Calmette-Guerin viables, que son los componentes de la vacuna desarrollada en éste instituto.

PALABRAS CLAVE: Leishmaniasis, Leishmania brasiliensis, vacuno, inmunoterapia, inmunoprophilaxis.

DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS BASED ON THE SPECTRUM OF CLINICAL-INMUNOLOGICAL MANIFESTATION AND POSSIBLE APPLICATION IN INMUNOPROPHYLAXIS.

SUMMARY

In this article, they are mentioned the investigational papers that have been carried out in the institute of Biomedicina, about the development of a vaccine against American Cutaneous Leishmaniasis. These papers have been based on the spectrum of clinical-immunological manifestations of the illness, as well as their possible application in inmunoprophylaxis, by the study of possible action mechanisms of the mixture of dead Leishmania promastigotes plus viable Bacillus of Calmette-Guerin, that are the components of the vaccine developed in this institute.

KEY WORDS: Leishmaniasis, Leishmania brasiliensis, vaccine, immunotherapy, immunoprophylaxis.

INTRODUCCIÓN

Dos enfermedades, la Lepra y la Leishmaniasis, comparten aspectos clínicos, histopatológicos e inmunológicos, lo que sugirió la posibilidad de que se pudiera usar una aproximación similar en los estudios de inmunoterapia e inmunoprophilaxis de ambas enfermedades (1, 2).

Las similitudes mencionadas en ambas afecciones, se expresan por medio de un espectro clínico e histopatológico, que refleja la respuesta del hospedador humano frente a la infección. Desde el punto de vista inmunológico, se observa claramente un defecto específico de la inmunidad mediada por células, representado por las formas polares progresivas de ambas afecciones, que se ha denominado inmunodeficiencia antígeno-específica. Esto refleja la presencia masiva del agente productor de la enfermedad en las células macrófágicas no diferenciadas, y demuestra la deficiencia inmune mencionada.



Figura 1
Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

Las personas afectadas por esta forma de la afección, tanto en Lepra como en Leishmaniasis, al realizarles pruebas intradérmicas con altas concentraciones ($6,4 \times 10^8$) de los antígenos específicos, desencadenan una respuesta de tipo nodular a las tres semanas de la inyección. La estructura es muy similar al granuloma de la enfermedad correspondiente, observándose que el antígeno permanece en el interior de las células durante largo tiempo. Esta es una respuesta estructural isomórfica, que se publicó con la denominación de Competency in Clearing Bacillary Test (CCB Test) (3), que expresaría la inmunodeficiencia específica para esa enfermedad. En la forma inmunodeficiente de ambas enfermedades, la prueba intradérmica con Bacilos de Calmette-Guerin (BCG),

demostró la formación de un granuloma inmune caracterizado por una estructura tuberculoide (4, 5).

En el estudio de las respuestas de estas formas polares (inmunodeficientes específicas), fue razonable indagar el tipo de respuesta a una mezcla de antígeno específico y BCG, observándose el desarrollo de un granuloma inmune,

con destrucción tanto del BCG como del antígeno específico (6). Por medio de este estudio se observó el cambio de la respuesta inmune, de inmunodeficiente a altamente eficiente. Gracias a este cambio “in situ” se liberarían los inmunógenos específicos correspondientes, lo cual hizo pensar en su uso posible como inmunoterapia para esta afección. En el caso de la Leishmaniasis, a esta forma polar se le ha denominado Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD), por la diseminación de las lesiones (Figura 1).

La mención de otras formas del espectro de la Leishmaniasis es absolutamente necesaria para el estudio del efecto inmunoterapéutico en la Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA). Fuera de la forma polar inmunodeficiente, hay dos formas adicionales de esta enfermedad que completan el espectro: la Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) (Figura 2) y la Leishmaniasis Cutánea Intermedia (LCI), esta última con sus variedades, Leishmaniasis Cutánea Intermedia cutánea (LCIc) (Figura 3) y Leishmaniasis Cutánea Intermedia mucosa (LCIm) (Figura 4) (9).



Figura 2
Leishmaniasis Cutánea Americana Localizada (LCL)



Figura 3
Leishmaniasis Cutánea Intermedia cutánea (LCI)



Figura 4
Leishmaniasis Cutánea Intermedia Mucosa (LCM)

La forma LCL es la forma más común de la enfermedad que se ve en el Continente Americano (94% de los casos); el resto está formado por la LCI y un 0,1% de los casos por la LCD, que se presenta en casos aislados o en pequeños grupos de 15 a 20 casos en una zona determinada.

La escogencia de la LCL para estudiar el efecto de la vacunación, con la mezcla de promastigotes de cultivos de Leishmania muertos más BCG viable, obedeció a la gran frecuencia de esta forma de la enfermedad y a la capacidad del hospedador de presentar una respuesta adecuada al estímulo inmunológico provocado por la inmunoterapia (IT).

En los otros constituyentes del espectro, las formas Intermedia y Difusa, existe un compromiso importante de la respuesta inmune. Este va desde una deficiencia total, como en el caso de la LCD, hasta un desequilibrio de la respuesta, como el que se observa en la LCI (cutánea y mucosa). Estos últimos pueden presentar trastornos

variables; de esa manera, un porcentaje de los casos puede responder a la IT, otros necesitan un tratamiento combinado de IT más quimioterapia (QT), y en un sector extremo, el tratamiento combinado de IT más QT no afecta las lesiones.

El concepto de trastorno inmune del área intermedia, ha sido aclarado por investigaciones realizadas en el Instituto de Biomedicina (IB), donde se ha determinado la existencia en dicho grupo de un trastorno en la respuesta Th1 y Th2, simultáneamente en diferentes grados, lo que explicaría la diversidad de las respuestas a la IT y QT.

APLICACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA

Se inició con un estudio comparativo, ciego y al azar, para un observador independiente, en dos grupos, uno tratado con IT (mezcla de parásitos muertos de *Leishmania brasiliensis* más BCG viable), y el otro con QT, a base de antimonial pentavalente. Estos grupos fueron suficientemente grandes como para que una diferencia de 15% fuera significativa, con un error alfa de 0,05, un error beta de 0,50 y un grupo mínimo de 34 participantes. Esta experiencia fue coordinada por un investigador independiente perteneciente a la Organización Panamericana de la Salud, el Dr. Pedro Luis Castellanos (7).

Los 94 pacientes incluidos en ese estudio fueron de una misma área, y el período del estudio fue de 12 meses. Los principales requerimientos fueron: pacientes mayores de 12 años, con lesiones localizadas de menos de un año de evolución, no tener contraindicaciones para el tratamiento y firmar un formulario de consentimiento informado. Previamente se obtuvo la aprobación del Comité Ético del IB para realizar este trabajo.

Los resultados mostraron tasas de curación similares (94%) tanto para los pacientes con IT como QT. En cambio, los efectos secundarios fueron escasos (5,8%) y leves en el grupo de IT, mientras que en el grupo de QT fueron frecuentes (52,4%) y a menudo severos.

Posteriormente se realizó otro trabajo con 217 casos de un solo foco endémico, bajo las mismas condiciones que el anterior (mayores de 12 años, lesiones localizadas de menos de un año de evolución, confirmación parasitológica, sin contraindicaciones para QT o IT y consentimiento informado por escrito (8).

Los pacientes fueron evaluados por medio de un examen clínico general, pruebas de laboratorio y pruebas intradérmicas con Leishmanina y Tuberculina. Posteriormente fueron distribuidos al azar en dos grupos control: uno que recibiría BCG solo (n=42) y otro a ser tratado con QT (n=51), y en un grupo activo (n=124). Los pacientes fueron evaluados cada 2 semanas por un observador independiente. Los resultados de los grupos con QT e IT fueron comparables (>90% de curaciones). La tasa de curación fue mucho menor en el grupo con BCG solo (42%). La tasa de efectos secundarios fue de 49% en el grupo con QT, y menor de 5% en los grupos con IT y BCG. Este estudio también incluyó 11 pacientes con formas intermedias de la enfermedad, los cuales mostraron curación o notable mejoría, y 10 pacientes con leishmaniasis difusa, 9 de los cuales también mostraron marcada mejoría clínica.

Durante el período comprendido entre 1990-1999 se aplicó IT a la LCL con carácter experimental en Venezuela. Un total de 11532 casos de LCL recibieron una mezcla de promastigotes de *Leishmania* muertos por calor más BCG liofilizado. De estos pacientes se evaluaron detalladamente 5341 casos, provenientes de diferentes áreas del país. La curación clínica varió entre 91,2% y 98,7%, con un promedio de 95,7%. Las reacciones adversas fueron muy moderadas y

todas debidas a la respuesta al BCG. La IT falló en 143 casos, incluyendo 54,5% con lesiones típicas de LCL y 45,5% con lesiones intermedias no mucosas. El número de fracasos en los casos de LCI sugiere que en dicho grupo se debe utilizar un tratamiento mixto (IT + QT) o aumentar el número de dosis de IT. (11, 12)

El alto porcentaje de curaciones clínicas logradas con la IT, asociada a muy pocos efectos secundarios y un bajo costo del tratamiento, debido a que no es necesario utilizar exámenes de laboratorio, ni la infraestructura necesaria para administrar inyecciones diarias, apoyan el uso de rutina de la IT en el medio rural, donde no existen estas facilidades.

En la Tabla 1 se presentan los datos numéricos de los casos con LCL de diferentes estados de Venezuela tratados con IT.

Estado (ubicación)	No. Pacientes tratados	Curación Clínica		Fallas del Tratamiento	
		n	%	n	%
Mérida (oeste)	1757	1734	98,7	23	1,3
Miranda (centro)	804	751	93,4	53	6,6
Anzoátegui (este)	1495	1364	91,2	131	8,8
Sucre (este)	1285	1263	98,3	22	1,7
Total	5341	5112	95,7	229	4,3

Tabla 1

Respuesta clínica a la inmunoterapia de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana Localizada en diferentes áreas de Venezuela (1990-1999)

En el curso del desarrollo de la IT en el Instituto de Biomedicina, y por el hecho de haberse presentado fallas a la IT con promastigotes autoclavados de *Leishmania brasiliensis* más BCG, en algunos casos de LCL, y frecuentemente en casos de LCI (cutánea y mucosa), se realizaron investigaciones para aumentar la efectividad del tratamiento en estas formas de la enfermedad. En este sentido, se realizaron estudios, por medio de electroforesis, de las proteínas del parásito leishmánico tratado a diferentes temperaturas, determinándose que la pasteurización a 56°C durante 30 minutos producía la muerte del parásito, con una discreta modificación de las proteínas del parásito leishmánico pasteurizado, en comparación con las proteínas del parásito no tratado. Con esta vacuna modificada, se realizó un estudio experimental en ratones BALB/c inoculados con *L. brasiliensis*, observándose ausencia de fenómenos secundarios y una respuesta más efectiva en comparación con la vacuna autoclavada.

Gracias a un convenio con el Instituto Nacional de Higiene, todos los lotes de vacuna pasteurizada fueron analizados en relación a muerte del parásito, esterilidad y toxicidad, determinándose que eran aptas para su uso en seres humanos.

Se realizaron cuatro estudios con la vacuna pasteurizada:

- a) Inmunoterapia Fase I
- b) Inmunopprofilaxis Fase I
- c) Inmunopprofilaxis Fase II
- d) Inmunoterapia en un pequeño grupo de pacientes que no respondían al tratamiento antimonial, 3 con lesiones de LCD incipientes y 4 con lesiones mucosas de LCI.

Para esta etapa de la investigación, los objetivos fueron:

Inmunopprofilaxis

- Evaluar la seguridad del producto propuesto en humanos
- Evaluar la capacidad del producto para generar respuesta inmunológicamente demostrable en humanos
- Determinar la mejor concentración de promastigotes requeridas para generar una adecuada respuesta inmunológica

Inmunoterapia

- Evaluar Seguridad, Tolerancia e Inmunogenicidad del antígeno de promastigotes inactivados por pasteurización más BCG, desarrollado en el Instituto de Biomedicina de Caracas Venezuela, en pacientes con diagnostico parasitológico de leishmaniasis cutánea localizada.



Figura 5
Leishmaniasis Cutánea Intermedia Mucosa (LCM)



Figura 6
Lesiones de Leishmaniasis Intermedia (LCI)

ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL INSTITUTO DE BIOMEDICINA

Fase I de inmunoprofilaxis

Se seleccionó la comunidad de Guayabal, localizada en el Municipio Santa Cruz de Mora del Estado Mérida, por ser un área con antecedentes importantes de casos de leishmaniasis y encontrarse actualmente sin actividad.

Se realizaron una serie de reuniones con las autoridades de salud locales para plantear el trabajo a realizar y lograr su autorización y colaboración en la realización del mismo.

Se realizaron encuestas en la comunidad para la selección de los voluntarios sanos, incluyendo la aplicación de la prueba intradérmica con leishmanina, la cual debía ser francamente negativa como requisito indispensable para el ingreso al protocolo. Del grupo total evaluado de cerca de 100 personas, se seleccionaron 14 que cumplían todos los requisitos.

El grupo quedó conformado por catorce individuos voluntarios sanos, con edades comprendidas entre los 18 y los 46 años, con un promedio de 28,57 años. En total participaron en el estudio 7 individuos del sexo femenino e igual número de individuos del sexo masculino. Cada uno de los grupos (GI y GII) se conformó de 7 individuos, en el grupo GI, 3 femeninos y 4 masculinos, mientras que en el grupo GII, 4 femeninos y 3 masculinos. De este grupo de 14 voluntarios, uno (IMP-007) recibió una sola dosis y posteriormente se excluyó del protocolo, por tener antecedentes médicos de úlcera gástrica, que no había referido durante el interrogatorio inicial.

El resto del grupo fue sometido a todos los requerimientos del protocolo, recibiendo tres dosis a los intervalos indicados. Se realizaron los exámenes de laboratorio prevacunación repitiéndose en dos ocasiones, posterior a la segunda y a la tercera dosis.

Los estudios inmunológicos previos al ingreso, fueron realizados a los 14 voluntarios, luego fueron divididos en dos subgrupos, a uno de los cuales se le practicó examen inmunológico posterior a la primera dosis y al otro posterior a la segunda dosis. Finalmente, a todos se les practicó examen inmunológico posterior a la tercera dosis.

El seguimiento diario de los efectos colaterales, tanto generales como locales, se realizó sin inconvenientes, mediante el llenado de un folleto diseñado para tal fin y bajo la orientación permanente del inspector de salud. Sólo se observaron efectos colaterales leves y dentro del rango esperado.

La aplicación de la intradermoreacción de Montenegro (leishmanina), se realizó en todo el grupo, observándose el viraje a una leishmanina positiva en todos los casos. En la actualidad se están realizando los análisis de los resultados de los exámenes inmunológicos.

Esta parte del trabajo fue ejecutada por el Dr. Héctor De Lima.

Fase II de inmunoprofilaxis

Para esta fase se seleccionó la población de Birongo, en cuyo casco y comunidades vecinas se registró un total de 1.655 habitantes, de ellos 430 (269 del sexo femenino y 161 del masculino) reunían los criterios de inclusión.

Los participantes fueron distribuidos al azar en dos grupos, uno de los cuales recibió dos dosis de la combinación de promastigotes pasteurizados más BCG y el otro recibió tres dosis, con intervalo de seis semanas entre las dosis, además de un tercer grupo que recibió dos dosis de BCG con seis semanas de intervalo entre dosis.

Previamente, a todos los participantes se les aplicó prueba intradérmica de leishmanina, aplicando sólo la dosis a los negativos. Esta prueba se repitió a las seis semanas de recibida la última dosis.

Se aplicaron dos dosis del producto combinado a 116 personas, 96 recibieron tres dosis, y el grupo que recibió BCG tuvo 105 individuos, de los cuales sólo 100 recibieron las dos dosis. 17 de las personas que iniciaron el estudio recibieron solo una dosis del producto combinado. A 28 de los voluntarios se les tomó muestra inicial de sangre y se tomó otra muestra seis semanas después de cada dosis.

Actualmente, ya se han suministrado todas las dosis previstas de la combinación de promastigotes más BCG, y se están aplicando las segundas pruebas intradérmicas de leishmanina a los voluntarios que recibieron las tres dosis. Además, se están tomando las muestras de sangre para los estudios de inmunidad celular a los 28 voluntarios seleccionados para realizarles la prueba.

Este trabajo fue realizado por el Dr. Federico Merckl.

Fase I de inmunoterapia

Se seleccionó la comunidad de Araitha, localizada en el Municipio Zamora del Estado Miranda, por ser un área con antecedentes importantes de casos de leishmaniasis y encontrarse actualmente en franca actividad, con un número de 125 casos reportados para el año 2002. Se realizaron una serie de reuniones con las autoridades de salud locales para plantear el trabajo a realizar y lograr su autorización y colaboración en la realización del mismo. El ambulatorio de Araitha cuenta con una consulta permanente (lunes, miércoles y viernes) exclusiva para leishmaniasis a cargo de la Dra. Aribel Cedeño.

Se evaluaron 85 pacientes, de los cuales solamente 9 cumplían con los requisitos necesarios para su ingreso al protocolo. Este grupo de 9 pacientes voluntarios, fue sometido a todos los requerimientos del estudio, recibiendo tres dosis a los intervalos indicados. Se realizaron los exámenes de laboratorio prevacunación, repitiéndose en dos ocasiones, posterior a la segunda y a la tercera dosis. Los estudios inmunológicos previos al ingreso fueron realizados a los 9 voluntarios, luego fueron repetidos después de la tercera dosis.

El seguimiento de los efectos colaterales, tanto generales como locales, se realizó sin inconvenientes, mediante el llenado de un folleto diseñado para tal fin y bajo la orientación permanente del inspector de salud. Sólo se observaron efectos colaterales leves y dentro del rango esperado. En la actualidad se está realizando el análisis de los resultados de los exámenes inmunológicos.

Este trabajo fue realizado por el Dr. Héctor De Lima.

Fase II de inmunoterapia

Actualmente en progreso, en el servicio central de Dermatología Sanitaria con sede en el Instituto de Biomedicina. Una experiencia en la comunidad de San Andrés durante un brote, permitió evaluar la eficacia del producto, al tratar 52 pacientes de un total de 62 casos diagnosticados, ya que 10 curaron espontáneamente en el intervalo entre la primera consulta y el diagnóstico. De ellos, 51 curaron y 1 se perdió de control. Ninguno tuvo efectos adversos.

Este trabajo fue realizado por la Dra. Belkis Blanco.

Con respecto a la última experiencia, en el tratamiento de pacientes con lesiones iniciales de LCD (n=3) y pacientes con lesiones mucosas de LCI (n=4), la mayoría de ellos no respondió al tratamiento con antimoniales pentavalentes. En un total de 7 pacientes, el mínimo de dosis varió entre 7 y 10. Actualmente tienen más de un año de observación con aparente curación. (13)

REFERENCIAS

1. Convit J. Leprosy and Leishmaniasis. Similar clinical-immunological-pathological models. Ethiopian Medical Journal, 1974; 12: 187-195.
2. Convit J, Aranzazu N, Pinardi ME, Ulrich M. Clinical and pathological aspects of leprosy and other diseases produced by intracellular parasites. Leprosy Excerpta Medica International Congress Series 466. 248-252 pp. 1980.
3. Convit J, Ávila JL, Goihman M y Pinardi ME. A test for the determination of competency in clearing bacilli in leprosy patients. Bull Wld Hlth Org 1972; 46: 821-826.
4. Convit J, Pinardi ME, Rodríguez Ochoa G, Ulrich M, Ávila JL y Goihman M. Elimination of Mycobacterium leprae subsequent to local in vivo activation of macrophages in lepromatous leprosy by other mycobacteria. Clin Exp Immunol 1974; 17: 261-265.
5. Convit J, Aranzazu N, Pinardi ME y Ulrich M. Immunological changes in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of Mycobacterium leprae and BCG. Clin Exp Immunol 1979; 36: 214-220.
6. Convit J, Ulrich M, Aranzazu N, Castellanos PL, Pinardi ME y Reyes O. The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis. Leprosy review 1986; 57(2): 263-273.
7. Convit J; Castellanos PL; Rondón AJ; Pinardi ME; Ulrich M; Castés M; Bloom B; García L. Immunotherapy Versus Chemotherapy in Localized Cutaneous Leishmaniasis. Lancet 1987; 1: 401-405.
8. Convit J; Castellanos PL, Rondón A et al. "Immunotherapy of Localized, Intermediate, and Diffuse forms of American Cutaneous Leishmaniasis". J Infect Dis 1989; 160: 104-115.
9. Convit J, Ulrich M, Fernández MT, Tapia F, Cáceres-Dittmar G, Castes, M. Rondón AJ. The Clinical and Immunological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis. Transac Royal Society of TMH 1993; 87: 444-448.
10. Convit J. Leishmaniasis. Immunological and Clinical Aspects and Vaccines in Venezuela. Clinics in Dermatology 1996; 14(5): 479-487.
11. Convit J; Ulrich M; Castellano P; Castés M; Pinardi ME; De Lima H; Zerpa O; Hernández N; Herz A. Desarrollo de Inmunoterapia de la Leishmaniasis Cutánea Americana en el Instituto de Biomedicina. Gaceta Médica de Caracas 1996; 104(3): 232-246.

12. Convit, J.; M. Ulrich, O. Zerpa, N. Aranzazu, , M. Valera, H. Villaroel, Z. Zapata, and I. Tomedes. Immunotherapy of American Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela, 1990 to 1999. *Transac Roy Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 1-4.
13. Convit, J.; M. Ulrich, M.A. Polegre, A. Avila, N. Rodríguez, M. Mazzeo, B. Blanco. Therapy of Venezuelan Patients with Severe Mucocutaneous or Early Lesions of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis with a Vaccine Containing Pasteurized *Leishmania* Promastigotes and BCG. Preliminary Report. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004, Vol. 99:00.