

## BCG NA VACINAÇÃO CONTRA *LEISHMANIA*

### BCG IN THE ANTI-LEISHMANIA VACCINATION

Ivan Pereira Nascimento<sup>1</sup>, Carolina Gandara Rosa<sup>1</sup>, Yurgan Targe Passos Santana<sup>2</sup>, Manuel Soto<sup>3</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-Bahia); <sup>2</sup>Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA; <sup>3</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autonoma de Madrid

A despeito das numerosas informações disponíveis sobre a genética e biologia da *Leishmania*, dos aspectos imunológicos da doença e da relação entre o parasita, o vetor e o hospedeiro, a partir de estudos experimentais e clínicos, não há vacinas efetivas contra diferentes espécies de *Leishmania*. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países, entre estes se encontram o Brasil e a Índia, sendo que a doença está concentrada nas camadas mais pobres destes países. Além das medidas de controle adotadas nestes países, o desenvolvimento de uma vacina deve também ser um objetivo importante para controlar esta enfermidade. Dentre as diversas formas de apresentação de antígenos ou candidatos vacinais contra *Leishmania* o uso da vacina BCG sempre mereceu um destaque especial. Inicialmente utilizada como um potente adjuvante acompanhando as formulações vacinais a partir de parasitos mortos. Atualmente projeta-se o uso da BCG como um veículo vivo para apresentação de antígenos heterólogos, explorando assim, as propriedades intrínsecas da vacina BCG e abrindo novas perspectivas para a produção de vacinas recombinantes.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, BCG, BCG recombinante, vacina, saliva de flebotomíneo.

*Despite the wealth of information available on the genetics and biology of Leishmania as well as on the immunological aspects of the disease, and the vector-parasite and host relationship there are no effective vaccine against different species of Leishmania. According to World Health Organization estimates, 90 per cent of visceral leishmaniasis cases occurs in five countries, including Brazil and India, and those in need are amongst the poorest people of these countries. Besides the established control measures adopted by these countries the development of a vaccine against visceral leishmaniasis is a priority. The use of BCG vaccine always had a special attention in the field of leishmaniasis vaccination. Initially, it was utilized as a potent adjuvant present in vaccinal formulation from killed parasites. Today it is considered as a live vehicle to presentation of heterologous antigens, exploring BCG own intrinsic properties and opening news perspectives for production of recombinant vaccines.*

**Key words:** *Leishmania*, BCG, recombinant BCG, vaccine, sand fly saliva.

#### Leishmanioses

Os parasitas do gênero *Leishmania* causam um espectro de doenças coletivamente conhecidas como leishmanioses, as quais ocorrem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais. As leishmanioses são transmitidas por diferentes espécies de flebotomos que levam à diferentes manifestações clínicas, dependendo das espécies envolvidas de *Leishmania*, bem como das diferenças genéticas e da resposta imunológica do hospedeiro. A leishmaniose cutânea (LC) é usualmente benigna, sendo que nos seres humanos leva ao desenvolvimento de uma lesão cutânea localizada, que eventualmente apresenta cura espontânea, e também indução de imunidade de longa duração. Entretanto no Novo Mundo, a LC causada pela *L. braziliensis*, apresenta características distintas como cronicidade e latência no homem (Bittencourt & Barral, 1991). A Leishmaniose Mucocutânea (LM) acomete de 1 a 5% dos pacientes infectados por *L. braziliensis* devido

à sua capacidade de produzir metástases nas mucosas (Moore and Matlashewski, 1994; Mendonça *et al.*, 2004). A leishmaniose cutânea é uma antropozoonose que pode ter como reservatórios animais selvagens, tais como roedores, cães e marsupiais. Este aspecto faz com que as medidas de controle sejam bastante complexas e reforça a necessidade do desenvolvimento de vacinas para uso humano. Por outro lado, a Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose na Índia e na África e uma zoonose transmitida por cachorros no Mediterrâneo e na América, o que levou à pesquisa de vacinas tanto para uso humano como para cães domésticos.

A necessidade de uma vacina segura e profilática para uso tanto no homem como em cães decorre do surgimento de cepas resistentes ao tratamento, da toxicidade das drogas existentes e do aumento da incidência da doença em pacientes imunocomprometidos além da dificuldade do controle epidemiológico baseado no sacrifício de cães soropositivos. A LV é causada pela *Leishmania donovani* (África, Índia e Ásia), pela *Leishmania chagasi* (América) e *Leishmania infantum* (Mediterrâneo). A LC é produzida pelos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis* nas Américas e *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo. Dado que todas as leishmanioses são causadas por espécies de *Leishmania* intimamente relacionadas filogeneticamente, o

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dra. Cláudia I. Brodskyn. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel.:55 71 3176-2211. Endereço eletrônico: brodskyn@bahia.fiocruz.br.

Gazeta Médica da Bahia

2009;79 (Supl.3):122-128

© 2009 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

desenvolvimento de uma única vacina polivalente é esperado e seria muito valiosa não somente para a profilaxia, mas também para o tratamento (Palatnik de Sousa, C. B., 2008).

### Resposta imunológica induzida por *Leishmania*

Grande parte do conhecimento da relação parasita hospedeiro nas leishmanioses advém de estudos em modelos com camundongos (Kaye *et al.* 2004; Tripathi *et al.* 2007). A progressão da leishmaniose murina está associada a uma resposta predominante de linfócitos do tipo Th2, produtoras de IL-4, enquanto que a resolução da doença se correlaciona com maior atividade de células Th1, produtoras de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Heinzel *et al.* 1989, Tripathi *et al.*, 2007). Porém, estes não são os únicos elementos implicados na progressão da doença. A produção de IL-10 por células regulatórias tem sido sugerida para explicar uma resposta não efetiva em alguns camundongos que apresentam uma resposta de perfil Th1 (Sacks *et al.* 2004). Outros componentes do sistema imunológico além das células T também exercem uma importante função. IL-12 que é liberada por macrófagos é um fator importante na estimulação de uma resposta Th1 contra leishmaniose (Sypek *et al.* 1993). Células dendríticas e neutrófilos têm funções regulatórias na estimulação de uma resposta tanto Th1 como Th2 contra a infecção (Moll *et al.*, 1993; Tacchini-Cottier, 2000) e mais recentemente, um estudo mostrou o papel de células regulatórias Th17 na leishmaniose cutânea, sugerindo que células IL-17<sup>+</sup> podem influenciar na progressão da doença via regulação de recrutamento de neutrófilos (Kostka *et al.*, 2009).

Esses e outros estudos têm revelado a complexidade da resposta em relação à susceptibilidade ou resistência às leishmanioses, as quais não são facilmente integradas em um modelo funcional simples, devendo corresponder melhor a uma rede interativa (Tripathi *et al.*, 2007).

### Uso de parasitas inteiros como vacina contra leishmaniose

As vacinas desenvolvidas ou em desenvolvimento contra *Leishmania* e que empregam produtos do parasita podem ser divididas em três categorias: (i) vacinas de primeira geração, compostas por parasitas mortos. Estas vacinas foram testadas no homem e em cães na América do Sul e no Sudão por volta de 1940. Elas induzem uma baixa proteção, em torno de 54%; (ii) vacinas de segunda-geração, que utilizam parasitas vivos modificados geneticamente, ou genes de leishmania expressos em bactérias ou vírus ou ainda frações nativas ou recombinantes de proteínas de *Leishmania* e (iii) as vacinas mais recentes, que incluem genes codificadores de antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucariotos (Palatnik de Sousa, B.C., 2008).

É antiga a observação que a recuperação de pacientes com leishmaniose cutânea é seguida por uma forte imunidade à doença. Semelhante à varíola, o exudato de lesões ativas foram inoculadas em crianças saudáveis para induzir uma lesão branda e curável que protegia contra lesões múltiplas sobre a face e outras partes do corpo (Seneki *et al.*, 1941). Esse tipo de

imunização ficou conhecido como “leishmanização” (LZ) e a forma promastigota viva e virulenta de *L. major*, recuperada dos exudatos, foi mais tarde substituída por parasitos cultivados em meio livre de células (Greenblat, C.L., 1980). No entanto, o perigo de se utilizar o organismo vivo, como a persistência do parasito no hospedeiro imune, levou à interrupção desse programa de imunização. A obtenção de clones de *L. major* que protegem camundongos vacinados contra uma infecção revelou que uma vacina viva atenuada era possível, mas a falta de conhecimento da mutação que levava a perda da virulência e o risco de reversão desses clones tornou esse tipo de vacina inaceitável (Nadim *et al.*, 1983; Modabber, 1995; Handman *et al.*, 2001). No entanto, outro estudo utilizando clones de uma cepa de *Leishmania major* de mutação definida (DHFR-TS) (Titus *et al.*, 1995) mostrou que esses clones sobreviviam em camundongos por dois meses sem produzir lesão e levavam a uma proteção significativa contra um desafio com uma cepa selvagem (Veras *et al.*, 1999). Ensaio *in vitro* deste clone com células de humanos apresentou um perfil de citocinas do tipo Th1, porém estudos posteriores em macacos não foram satisfatórios o suficiente para levar adiante o desenvolvimento desta vacina (Kamesipour *et al.*, 2006). Tudo isso gerou um interesse renovado nas vacinas a partir dos parasitos mortos. As primeiras triagens clínicas com promastigotas mortas foram conduzidas no Brasil na década de 40 e mostrou níveis de proteção que variaram de 82% a nenhum efeito (De Luca *et al.*, 1999). Semelhantes a outras vacinas mortas, como por exemplo, a raiva ou influenza, essa se mostrou também inferior à vacina viva, possivelmente por causa do estímulo contínuo do sistema imunológico produzido pelas vacinas vivas, decorrente da persistência dos parasitos no hospedeiro. Uma outra razão pode ser que a inoculação de promastigotas mortas não mimetize a doença. O hospedeiro processaria os antígenos do parasito morto diferentemente daquele dos organismos vivos, induzindo um tipo de resposta imunológica diferente quando comparado com a infecção natural. Na década de 70, Mayrink *et al.* desenvolveram uma vacina morta composta de cinco isolados de *Leishmania* contendo quatro espécies diferentes (Genaro *et al.*, 1996). Essa foi então simplificada para uma única espécie (*L. amazonensis*) e seu potencial profilático testada na Colômbia (Armijos *et al.*, 2004) e Equador (Vélez *et al.*, 2005) e como um complemento à quimioterapia no Brasil (Jackson *et al.*, 2002).

As várias tentativas de vacinação com antígenos definidos e do parasita foram infrutíferas.

O conjunto de estudos em vacina contra leishmaniose mostra que nem todos os antígenos são protetores no modelo animal, o que tem levado à seleção de somente uns poucos antígenos como candidatos vacinais.

A glicoproteína de superfície de *Leishmania* (gp63) foi um dos primeiros antígenos definidos testado como vacina contra este parasita. Camundongos imunizados com essa proteína foram protegidos contra uma infecção com *L. mexicana* (Russel & Alexander, 1988). Um outro antígeno testado em

seguida aos estudos com gp63 foi a proteína LACK. Os trabalhos mostraram que LACK, apresentado na forma de vacina de DNA, levava a uma resposta protetora tão eficaz quanto aquela apresentada pela proteína utilizando a IL-12 como adjuvante e melhor do que a proteção induzida pela proteína sozinha (Khamesipour *et al.*, 2006). Inúmeros antígenos, considerados promissores, estão sendo usados, tanto como proteínas recombinantes ou como vacinas de DNA contra *Leishmania*. Dentre estes candidatos podemos destacar as proteinases cisteínas, CPA e CPb; uma proteína anti-virulência denominada de A2 e uma classe de proteínas referidas como antígenos hidrofílicos acilados de superfície (HASPs). Pacientes recuperados de *Leishmania* contém anticorpos que reagem contra os antígenos CPA e CPb recombinantes, sugerindo que essas proteínas podem ser alvos importantes da resposta imunológica contra essa doença. Foi mostrado também que vacinas de DNA codificando estes dois antígenos conferiam proteção, mas somente quando inoculados juntos (Rafati *et al.*, 2001). Uma família de genes denominada de A2 que está presente em *L. donovani*, mas não em *L. major* foi caracterizada como um importante fator de virulência (Zhang and Matasheusk, 2001). Uma vacina de DNA contendo A2 foi capaz de induzir uma resposta humoral e celular e também conferir proteção significativa em camundongos contra um desafio com *Leishmania* (Gosh *et al.*, 2001). As proteínas da classe HASPs, também são antígenos que estão sendo usados como candidatos vacinais potenciais contra leishmaniose visceral. Animais imunizados com HASPB1 sofreram uma redução da carga parasitária no baço, órgão importante na infecção por LV (Stager *et al.*, 2000). Resultados promissores, usando macacos, foram obtidos com uma vacina recombinante composta por uma proteína antioxidante tiol-específica (TSA) em fusão com uma outra proteína que responde ao estresse e a temperatura (STI1). Esta proteína de fusão TSA-STI1, quando administrada com IL-2 mais alumínio como adjuvantes, conferiu uma proteção completa contra um desafio com *Leishmania*. Essa combinação de antígeno em particular é considerada um forte candidato para uma vacina composta de subunidades contra leishmaniose humana (Campos-Netto *et al.*, 2001). Um outro estudo foi realizado, utilizando esta proteína fusionada a proteína LeIF, sendo esta combinação denominada de Leish-111f. Esta é a única vacina de segunda geração contra leishmanioses que está sendo testada em ensaios clínicos. A triagem inicial, avaliando a segurança e dose, conduzida nos Estados Unidos, produziu resultados satisfatórios (Khamesipour *et al.*, 2006). Embora esses resultados sejam promissores, até o momento, todas as tentativas de desenvolvimento de uma vacina contra *Leishmania* baseada somente em antígenos do parasita se mostraram infrutíferas.

#### **As possibilidades de vacinação com antígenos da saliva do vetor são promissoras.**

Outra estratégia que também está sendo estudada no combate à *Leishmania* é a imunização do hospedeiro contra

proteínas da glândula salivar do vetor transmissor (Valenzuela *et al.*, 2001a; Andrade *et al.*, 2007). É conhecido que a saliva desse vetor potencializa a infecção provocada por *Leishmania* (Titus and Ribeiro, 1988) e que a imunidade adquirida contra essa saliva, obtida através da co-inoculação do parasito com sonicação da glândula salivar do vetor (SGSs) ou pela picada do vetor infectado, protege contra uma infecção por *Leishmania* (Kamhawi, S. *et al.*, 2000). Há duas hipóteses, que não são mutualmente exclusivas, para explicar essa proteção. Primeiro, a resposta imunológica do vertebrado às proteínas salivares do inseto, particularmente anticorpos, poderia neutralizar o efeito do componente ou componente(s) salivar(es) responsável(is) pelo estabelecimento do patógeno (Morris *et al.*, 2001). Segundo, a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado às proteínas salivares cria um ambiente inóspito para o patógeno, que pode tanto ser morto ou ter seu desenvolvimento futuro negativamente afetado no sítio da picada (Kamhawi *et al.*, 2000). No homem, Barral e col. mostraram uma correlação entre a resposta imunológica para proteínas salivares de *Lu. longipalpis* e uma resposta imuno celular para *Leishmania chagasi*, considerando a resposta imunocelular contra a *Leishmania* como mecanismo protetor podemos considerar uma evidência epidemiológica importante (Barral *et al.*, 2000). Alguns antígenos salivares são mais frequentemente reconhecidos pelas resposta imune humana e relacionados com a provável proteção contra leishmanioses (Gomes *et al.*, 2002).

As proteínas da saliva dos flebotomíneos induzem uma resposta de hipersensibilidade cutânea tardia (HCT) que parece facilitar a sua alimentação no hospedeiro vertebrado. O efeito protetor das proteínas salivares dos flebotomíneos pode estar relacionado à indução do HCT por estas moléculas, provavelmente através de células T CD4 (Valenzuela *et al.*, 2001b). Camundongos vacinados com uma proteína identificada na glândula salivar de *Phlebotomus papatasi* (PpPS-15) produziram uma forte resposta de HCT assim como anticorpos em camundongos C57BL/6, resultando numa proteção contra uma infecção por *L. major* quando os parasitas eram co-inoculados com SGS. Além disso, há evidências que a HCT foi responsável pela proteção observada contra *Leishmania* e que os anticorpos não eram necessários (Valenzuela *et al.*, 2001a). Num recente trabalho, foi demonstrado que o antígeno da saliva de *L. longipalps* (LJM19) inoculado como vacina de DNA em hamster conferiu uma forte proteção contra um desafio com *Leishmania chagasi* (Gomes *et al.*, 2008).

#### **O uso do BCG na vacinação contra leishmaniose: BCG leva à proteção parcial contra leishmaniose**

Algumas das vacinas contra leishmaniose formuladas a partir de promastigotas mortas de *Leishmania* apresentavam o *M. bovis* BCG como adjuvante. Convit *et al.*, pioneiros neste tipo de abordagem, introduziram na Venezuela uma vacina feita a partir de *L. mexicana* ou *L. braziliensis* autoclavada mais BCG como imunoterápica ou imunoquimioterápica (Castes *et al.*, 1989). Alguns estudos profiláticos foram conduzidos

com resultados inconclusivos ou uma baixa proteção induzida por esta vacina (Genaro *et al.*, 1996). No Equador, duas doses de uma vacina composta de *L. amazonensis* e *L. mexicana* associadas com BCG induziram 73% de proteção (Armijos *et al.*, 1998). No entanto, estudos posteriores realizados para confirmar esses resultados foram considerados inconclusivos (Armijos *et al.*, 2004).

No Iran, uma vacina composta por uma combinação de *L. major* morta mais BCG demonstrou pouca diferença na incidência da doença entre o grupo vacinado com BCG sozinho e o grupo imunizado com BCG mais a vacina, mostrando que o BCG leva à proteção parcial contra leishmaniose. No entanto, em um segundo estudo foi mostrado que por períodos maiores de tempo, a vacina combinada era mais eficaz do que o BCG sozinho, sugerindo que o efeito imunoestimulatório desta poderia ser apenas transiente (Handman, 2001).

A combinação de *L. major* e BCG contra *L. donovani* foi também eficaz em macacos. Três doses de 1 mg de *L. major* autoclavada (ALM) mais 1 mg de BCG foram inoculadas pela via intradérmica e a vacina se mostrou efetiva por 8 meses. Esse estudo indicou que uma combinação de ALM mais BCG poderia ser um bom candidato vacinal contra *Leishmania* humana (Misra *et al.*, 2001).

A vacina mais simples composta de 1 mg de proteínas de *L. major* mais BCG e testada até o momento foi administrada por via intradérmica em dose única. Embora esta formulação tenha se mostrado segura, somente 35% dos indivíduos vacinados tornou-se sensibilizados após o teste intradérmico. Se considerarmos esse teste de conversão como um importante marcador de correlação com a proteção, podemos dizer que esta vacina não foi eficaz, sugerindo que seriam necessárias múltiplas doses para se aumentar a imunogenicidade (Handman, 2001). No Iran também, uma triagem controlada de um ensaio duplo-cego e randomizado com uma vacina de *L. major* mais BCG contra LC, foi realizada em voluntários sadios. Uma única dose desta vacina se mostrou segura, sem evidência de uma resposta exacerbada após infecção natural (Momeni *et al.*, 1999).

### **BCG como um veículo vivo para apresentação de antígenos heterólogos**

Hoje o BCG é a vacina mais utilizada no mundo, tendo já sido administrada a 3 bilhões de indivíduos, com uma frequência baixíssima de efeitos adversos sérios (Gicquel *et al.*, 1995). Isto torna o BCG um bom candidato a veículo para apresentação de antígenos heterólogos, pois abreviaria significativamente uma possível validação de uma vacina recombinante baseada em BCG. Uma vacina multivalente utilizando BCG como veículo vivo apresentaria vários outros fatores vantajosos (Barletta *et al.*, 1990; Stover *et al.*, 1992; Gicquel, 1995) como:

- i. o BCG é a única vacina recomendada pela WHO (Organização Mundial da Saúde) para ser administrada ao nascimento;
- ii. requer apenas uma imunização para conferir imunidade

celular duradora, pois o BCG pode permanecer no organismo por anos (dependendo do indivíduo) - a apresentação contínua dos antígenos eliminaria a necessidade de programas de vacinação seqüenciais, que é o caso de diversas vacinas em uso atualmente;

- iii. envolve uma produção de baixo custo;
- iv. o BCG é o mais efetivo adjuvante conhecido para indução de imunidade celular em animais e no homem; e
- v. estudos recentes têm re-analisado a possibilidade de uma vacinação oral com BCG, demonstrando a indução de uma forte resposta imunológica e até proteção contra um desafio com *Mycobacterium tuberculosis* que foi equivalente ao apresentado pela via subcutânea (Vipond *et al.*, 2008).

A administração oral eliminaria o risco associado à utilização de seringas e reduziria o custo das campanhas de vacinação. Todas estas vantagens sugerem o uso de cepa viva atenuada de BCG como veículo multivacinal para a indução de imunidade humoral e celular contra diversos patógenos (Cirillo *et al.*, 1995; Gicquel, 1995; Stover *et al.*, 1992).

### **Expressão de antígenos heterólogos em BCG**

Após o estabelecimento da técnica de obtenção de transformantes de micobactérias, inclusive BCG, selecionados por resistência a kanamicina, em 1990 foi produzido um BCG recombinante (rBCG) com expressão de um epitopo de 8 aminoácidos de gag p17 de HIV-1 como um produto de fusão com o antígeno á de micobactéria (Matsuo *et al.*, 1990). Em seguida, em 1991 vários laboratórios conseguiram a expressão de antígenos inteiros de HIV-1, como: gag, rt, polA, gp120 e gp41, utilizando vetores ponte onde a expressão dos antígenos era dirigido pelos promotores para proteínas de choque térmico de BCG, hsp60 (pMV261, replicativo ou pMV361, integrativo) (Stover *et al.*, 1991); ou hsp70 (pYUB12) (Aldovini *et al.*, 1991; Stover *et al.*, 1991); ou a proteína nef sobre de uma proteína de choque térmico de *streptomyces*, o groES/groEL (pRR3) (Winter *et al.*, 1991). Estes estudos demonstraram que BCG recombinante expressando proteínas heterólogas provocava os 3 tipos de resposta imunológica necessários para proteção contra vários patógenos: i) produção de anticorpos IgG por células B, ii) proliferação de linfócitos T e produção de linfocinas inclusive interferon gama, iii) e produção de linfócitos T- citotóxicos com restrição por classe I do complexo principal de histocompatibilidade.

Vacinas de rBCG expressando proteínas heterólogas têm demonstrado indução de uma resposta imunológica contra os respectivos patógenos e, em alguns casos, proteção. A expressão da proteína OspA de *B. burgdorferi* na superfície da BCG produziu uma vacina que induziu imunidade humoral e levou à proteção contra um desafio subsequente (Langermann *et al.*, 1994a). BCG expressando a subunidade 1, não tóxica, da toxina pertussis, induziu uma resposta celular em camundongos e conferiu proteção contra um desafio intracerebral (Nascimento *et al.*, 2000). O antígeno gp63 de

*Leishmania major* expresso em BCG sob controle de dois promotores diferentes induziu resposta imune celular e proteção em camundongos (Abdelhak *et al.*, 1995; Connell *et al.*, 1993).

### **BCG recombinante como uma proposta que associa, potencialmente, todas as vantagens das situações anteriores**

Uma vacina ideal contra leishmaniose deveria possuir algumas propriedades, tais como: ser segura; induzir proteção duradoura para a maioria ou todas as espécies patogênicas do parasito e com um número mínimo de imunizações; ser livre de produtos de origem animal usados para a manufatura do produto final; ser de baixo custo e efetiva tanto profilática como terapêuticamente. Para desenvolver tal vacina é essencial, além da caracterização de antígenos protetores, criar ou desenvolver sistemas de entrega ou apresentação desses antígenos, que possam ser melhorados ou levados efetivamente a processos que seguem padrões de produção científicos e regulamentados. É consenso, entre os pesquisadores na área, que uma vacina contra *Leishmania* deverá conter mais de um antígeno, sendo estes preferencialmente conservados entre as diferentes espécies e expressos nos dois estágios ou formas do parasito. Muitos dos antígenos em estudo hoje possuem esses critérios, mas poucos protegem contra mais de uma espécie em modelo animal. Além da proteção, outra consideração importante é quanto a segurança. Muitos dos antígenos protetores de *Leishmania* são altamente conservados com proteínas de mamíferos, portanto, testes terão que ser feitos para assegurar que uma resposta autoimune não seja induzida.

Vacinas contra *Leishmania* baseadas em rBCG já foram construídas e testadas anteriormente. BCG recombinante expressando a proteína gp63 conferiu uma imunização efetiva contra leishmaniose cutânea em camundongos, sendo este o primeiro trabalho a mostrar o potencial do BCG como um veículo vivo para apresentação de antígenos de leishmania (Connell *et al.*, 1993). Um outro trabalho também mostrou o potencial do uso de rBCG expressando gp63 em induzir uma proteção significativa, porém parcial, contra um desafio com *Leishmania major*, tanto em animais susceptíveis (BALB/c) como resistentes (C57BL/6) (Abdelhak *et al.*, 1995). Mais recentemente, Streit *et al.* publicaram um trabalho mostrando que rBCG expressando o antígeno LCR1 de *L. chagasi* também induz imunidade protetora em camundongos susceptíveis. Neste mesmo trabalho o autor menciona, que uma vacina de BCG recombinante mais efetiva deveria consistir de uma combinação de rBCG expressando diferentes antígenos de *Leishmania* (Streit *et al.*, 2000). Além disso, ele aponta também para a necessidade de se desenvolver uma vacina de rBCG sem gene de resistência a antibiótico, como pressão seletiva, para manter o plasmídeo na micobactéria e, conseqüentemente, a expressão do antígeno.

As novas tendências da vacina em leishmaniose, como a inclusão de proteínas da saliva de flebotomíneos, precisam ser testadas em BCG recombinante. Ela poderá associar,

potencialmente, as vantagens das situações anteriores, ou seja: utilizar mais de um antígeno, sendo um do parasito e o outro presente na glândula salivar do vetor transmissor da infecção. Estes antígenos deverão ser ambos altamente conservados em todas as suas respectivas espécies. Assim, antígenos que são fortes candidatos vacinais, utilizarão um sistema de apresentação destes antígenos, baseado em um veículo vivo, que também é usado como adjuvante em formulações vacinais e perfeitamente viável para ser produzido de acordo com as especificações técnicas e científicas.

### **Referências**

1. Abdelhak S, Louzir H, Timm J, Blel L, Benlasfar Z, Lagranderie M, Gheorghiu M, Dellagi K, Gicquel B. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology* 14:1585-1592, 1995.
2. Aldovini A, Young RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines [see comments]. *Nature* 351: 479-482, 1991.
3. Andrade BB, Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66:122-127, 2007.
4. Armijos RX, Weigel M.M., Calvopina, M., Hidalgo, A., Cevallos, W. and Correa, J. (2004) Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22: 1320-1336.
5. Armijos, RX, Weigel MM, Aviles H, Maldonado R, Racines J. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at risk child population: safety, immunogenicity and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J. Infect. Dis.* 177:1352-1357, 1998.
6. Barletta RG, Snapper B, Cirillo JD, Connell ND, Kim DD, Jacobs WR, Bloom BR. Recombinant BCG as a candidate oral vaccine vector. *Res Microbiol* 141:931-939, 1990.
7. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab, R, Barral-Netto M, Ribeiro JM. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg.* 62:740-745, 2000.
8. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:51-56, 1991.
9. Campos-Neto A, Porrozzini R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, Grimaldi Jr G. Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. *Infect Immun.* 69:4103-4108, 2001.
10. Castes M, Moros Z, Martinez A, Trujillo D, Castellanos PL, Rondon AJ, Convit J. Cell-mediated immunity in localized cutaneous leishmaniasis patients before and after treatment with immunotherapy or chemotherapy. *Par Imm.* 11:211-222, 1989.
11. Cirillo JD, Stover CK, Bloom BR, Jacobs WJ, Barletta RG. Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guerin. *Clin Infect Dis* 20:1001-1019, 1995.
12. Connell ND. *et al.* Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11473-11477, 1993.
13. De Luca PM. *et al.* Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17:1179-1185, 1999.

14. Genaro O, de Toledo VP, Da Costa CA, Hermeto MV, Afonso LC, Mayrink W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin Derm* 14:503-512, 1996.
15. Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine* 19:3169-3178, 2001.
16. Gicquel B. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* 23: 113-118, 1995.
17. Gomes RB, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa J, Miranda JC, Caldas A, Valenzuela, JG, Barral-Netto M, Barral, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Inf Dis* 186:1530-1534, 2002.
18. Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaïem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:7845-7850, 2008.
19. Greenblatt CL. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. In: Mizrahi A, Hertman I, Klingberg MA, Kohn A, editors. *New developments with human and veterinary vaccine*. New York: Alan R Liss Inc, 1980 p. 259-85.
20. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14:229-243, 2001.
21. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon  $\alpha$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169:59-72, 1989.
22. Jackson MP, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Derm* 41: 73-78, 2002.
23. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290:1351-1354, 2000.
24. Kaye PM, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. A review of the distinct tissue responses and the various pathological changes that are caused by *Leishmania* parasites. *Immunol Rev* 201:239-253, 2004.
25. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*. 123:423-438, 2006.
26. Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 182:3039-3046, 2009.
27. Lagranderie M, Murray A, Gicquel B, Leclerc C, Gheorghiu M. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine* 11:1283-1290, 1993.
28. Langermann S, Palaszynski S, Sadziene A, Stover CK, Koenig S. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 372:552-555, 1994.
29. Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, Kobayashi K, Yukitake H, Yamada T. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun* 58:4049-4054, 1990.
30. Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Inf Dis* 189:1018-1023, 2004.
31. Misra A, Dube A, Srivastava B, Sharma P, Srivastava JK, Katiyar JC. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Vaccine* 19:3485-3492, 2001.
32. Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 89: 83-88, 1995.
33. Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 14:383-387, 1993.
34. Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Labaf Ghassemi R, et al. A randomized, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 17:466-472, 1999.
35. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*. 152:2930-2937, 1994.
36. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol*, 167:5226-5230, 2001.
37. Nadim A, et al. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull. Soc. Pathol Exot Filiales* 76:377-383, 1983.
38. Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, Gebara VC, Cardoso DF, Ho PL, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LC. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun*. 68: 4877-4883, 2000.
39. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 14: 1709-1724, 2008.
40. Rafati S, Salmanian AH, Taheri T, Vafa M, Fasel N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* 19:3369-3375, 2001.
41. Russell DG, Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol* 140: 1274-1279, 1988.
42. Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 201:225-238, 2004.
43. Senekji HA, Beattie CP. Artificial infection and immunization of 368 men with cultures of *L. tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 369: 415-9, 1941.
44. Stager S, Smith DF, Kaye PM. Immunization with a Recombinant Stage-Regulated Surface Protein from *Leishmania donovani* Induces Protection Against Visceral Leishmaniasis. *J Immunol* 165:7064-7071, 2000.
45. Stover CK, De LCV, Bansal GP, Hanson MS, Fuerst TR, Jacobs WJ, Bloom BR. Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. *Adv Exp Med Biol* 327:175-182, 1992.
46. Stover CK, De LCV, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456-460, 1991.
47. Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, Wilson ME. BCG Expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* Induces Protective Immunity in Susceptible Mice. *Exp Parasitol* 94:33-41, 2000.
48. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177:1797-1802, 1993.
49. Tacchini-Cottier F, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol*. 165:2628-2636, 2000.
50. Timm J, Perilli MG, Duez C, Trias J, Orefici G, Fattorini L, Amicosante G, Oratore A, Joris B, Frere JM, et al. Transcription and expression analysis, using lacZ and phoA gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum* beta-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level beta-lactamase producer. *Mol Microbiol* 12: 491-504, 1994.

51. Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306-1308, 1988.
52. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA, Beverley SM. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10267-102671, 1995.
53. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 229-242, 2007.
54. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194:331-342, 2001.
55. Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JM. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *J Exp Biol* 204:229-237, 2001.
56. Velez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM. *et al.* Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 593-598, 2005.
57. Veras P, Brodskyn C, Balestieri F, Freitas L, Ramos A, Queiroz A, *et al.* A dhfr-ts- *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:491-496, 1999.
58. Vipond J, Cross ML, Lambeth MR, Clark S, Aldwell FE, Williams A. Immunogenicity of orally-delivered lipid-formulated BCG vaccines and protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Inf* 10:1577-1581, 2008.
59. Winter N, Lagranderie M, Gangloff S, Leclerc C, Gheorghiu M, Gicquel B. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* 13:471-478, 1995.
60. Winter N, Lagranderie M, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Guy B, Kieny MP, Gheorghiu M, Gicquel B. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* 109:47-54, 1991.
61. Yang DM, Kahl LP, Liew FY. Oral *S. typhimurium* (AroA) vaccine expressing leishmanial surface protein (gp63) preferentially induced Th1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 145:2281-2285, 1990.
62. Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol.* 39: 935-948, 2001.