

# SÍNTESE DO TRABALHO

## VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL

### Objetivos

Desenvolver e testar formulações vacinais contendo o antígeno recombinante A2 contra a leishmaniose visceral (LV)

### Resultados

#### Imunogenicidade e eficácia de proteção em camundongos

Diversos antígenos foram avaliados comparativamente, em camundongos, contra a leishmaniose visceral (LV). Dentre os antígenos testados, A2 foi capaz de induzir anticorpos IgG2a e altos níveis de IFN- $\gamma$ , levando a redução do tamanho da lesão e do número de parasitas em animais imunizados. Análises *in silico* e ensaios de ELISA, ELISPOT e de citotoxicidade *in vivo* revelaram que a proteína A2 contém epítopos para células T CD4 e CD8 e B.

#### Leish-Tec<sup>®</sup>: vacina contra LV canina baseada no antígeno A2.

Em 2004, foi realizada a transferência de tecnologia entre UFMG e o Laboratório Hertape, permitindo a produção do antígeno recombinante A2, em condições GMP (Good Manufacture Practice). Posteriormente, o Ministério da Agricultura forneceu a licença para o laboratório Hertape Calier comercializar a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, que contém A2. Leish-Tec<sup>®</sup> foi então avaliada em estudo de fase II, em cães Beagle. Os animais vacinados produziram níveis significativos de anticorpos IgG2 e de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10, em resposta a A2. Em contraste, animais do grupo-controle apresentaram níveis elevados de IL-10 e anticorpos IgG1. Após a infecção desafio com *L. infantum*, nos animais do grupo controle, os sintomas da infecção apareceram aos três meses e se apresentaram mais graves. Já entre os animais vacinados, 5 permaneceram assintomáticos ao longo dos testes e 2 apresentaram sintomas brandos da doença, que apareceram um ano após a infecção. Além disso, os cães vacinados permaneceram negativos em testes sorológicos com antígenos de promastigotas, indicando que a vacinação com A2 permite a distinção sorológica entre cães imunizados e infectados. Estes resultados foram confirmados em uma população heterogênea de cães.

#### Estudos Clínicos fase III duplo-cego e aleatório da Leish-Tec em área hiperendêmica para LV

Um estudo duplo-cego de fase III foi realizado para testar a eficácia da Leish-Tec<sup>®</sup> em área endêmica para LVC (Porteirinha, Minas Gerais). Os cães selecionados (n = 1650) receberam as doses de Leish-Tec<sup>®</sup> ou placebo. Análises parasitológicas, sorológica e clinico-laboratoriais, foram realizadas, durante dois anos. Com base em dados parasitológicos foi verificada eficácia vacinal de 82%, considerando os animais que converteram a sorologia para o antígeno A2. Foi observada também redução de 41% na transmissibilidade da infecção, com base nos dados de xenodiagnóstico. Um relatório dos resultados foi enviado ao MAPA e MS para avaliação, que foi aprovado, permitindo a concessão ao Laboratório Hertape Calier do registro definitivo da vacina.

#### Prospecção de novos antígenos por análises proteômicas

O acúmulo de informação de genomas de patógenos, acompanhado de avanços na área de química de proteínas e tecnologia recombinante, certamente tem revolucionado o campo de desenvolvimento de vacinas. A separação de proteínas por eletroforese bidimensional, seguida de espectrometria de massas é uma tecnologia poderosa para identificação de

expressão diferencial de proteínas. O acoplamento de anticorpos em análise imunoproteômicas permite um refinamento de tal análise, identificando potenciais antígenos.

Nos últimos anos, com o intuito de identificar novos antígenos para o desenvolvimento de vacinas contra a LV, além de análises proteômicas comparando proteínas expressas em amastigotas versus promastigotas, avaliamos a reatividade de soros de cães assintomáticos e sintomáticos frente a proteínas expressas por amastigotas e promastigotas axênicas (Coelho et al. 2012). Mais de 550 “spots” foram detectados e aproximadamente 106 proteínas foram identificadas por MALDI/TOF-TOF, incluindo várias proteínas hipotéticas. Algumas dessas proteínas são específicas de *Leishmania* e encerram a possibilidade de serem mais específicas para o diagnóstico e vacinas para as leishmanioses, uma vez que reatividade cruzada é um dos aspectos limitantes dos atuais métodos sorológicos. Outras estão associadas, de forma similar ao antígeno A2, à capacidade dos parasitas de algumas espécies de *Leishmania* de visceralizar a infecção, migrando da pele onde são depositados pelos flebótomos para órgãos como fígado e baço. Em conjunto, os resultados obtidos a partir de anticorpos acoplados à análise proteômica representam uma enorme quantidade de dados disponíveis para análises funcionais e estruturais da biologia do parasito e para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico (Coelho et al. 2012). Alguns dos antígenos identificados foram testados também para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico da leishmaniose (Costa et al., 2012, Chavez-Fumagalli et al., 2012).

### **Em busca da vacina para a Leishmaniose visceral humana**

#### **Testes pré-clínicos em primatas não-humanos (*Macaca mulata*)**

Um estudo pré-clínico em macacos (*Macaca mulata*) foi conduzido, com o objetivo de testar a imunogenicidade e a capacidade de induzir a proteção de vacinas contendo A2, administrados através de protocolos homólogos e heterólogos, em grupos de 5 macacos, com adenovírus (Ad-A2) ou plasmídeo expressando A2 ou a A2 recombinante (rA2). Os macacos foram desafiados com *L. infantum*. Animais que receberam o antígeno A2 responderam à vacinação com níveis aumentados de anticorpos. Em comparação aos animais controle, que mantiveram alto número de parasitas e granulomas no fígado, durante o período de avaliação, os macacos vacinados mostraram uma capacidade significativa de controlar a replicação do parasita. Em alguns grupos, a eliminação completa do parasita e resolução dos granulomas foram observadas em biópsias hepáticas. Análise por PCR em tempo real confirmaram esses dados. Estes resultados são promissores sob a perspectiva do desenvolvimento de vacinas contra LV humana, já que macacos Rhesus constituem um dos modelos de infecção mais próximos a LV humana.

#### **Adjuvante para uma vacina contra a LV humana**

A empresa Glaxo Smith Kline tem investido no desenvolvimento de alternativas de adjuvantes para uso em vacinas humanas, criando a linha “AS” (Adjuvant System). Essas adjuvantes já foram testadas em populações humanas com elevada segurança. Uma parceria com a GSK foi firmada recentemente com a UFMG e FIOCRUZ, para investigar a associação entre o adjuvante AS e o antígeno A2, e assim desenvolver uma vacina contra a LV humana. Os testes em animais se encontram em andamento. Após essa fase, teremos uma formulação final para iniciar os testes de fase 1 em humanos.

### **Conclusões**

Avanços consideráveis foram alcançados em relação ao desenvolvimento de vacinas

recombinantes contra a LV, contendo o antígeno A2.

### **Aplicabilidade**

Uma vacina como a Leish-tec® representa não só um avanço na profilaxia da LV canina, mas também a perspectiva de reduzir as taxas de transmissão da LV para as populações humanas. É também um passo importante para se alcançar uma vacina segura e eficaz para as populações humanas, aspectos que norteiam a parceria do grupo de pesquisadores com a empresa GSK, vislumbrando a melhoria da qualidade de vida das pessoas nas comunidades afetadas pela doença.

### **Palavras-chave:**

Leishmaniose visceral; vacina Leish-tec®; antígeno A2 recombinante; testes em camundongos, cães, primatas não-humanos; inovação tecnológica e transferência de tecnologia.