TUBERCULOSE

Prevenindo e tratando

Pesquisadores de Ribeirão Preto desenvolvem a primeira vacina gênica contra a doença

Desde que o alemão Robert Koch anunciou a descoberta do bacilo da tuberculose, em 1882, a prevenção e o tratamento da doença desafiam cientistas em todo o mundo. E pela dimensão que essa doença infecto-contagiosa alcança na atualidade, torna-se particularmente importante o desenvolvimento de uma nova vacina contra a tuberculose por uma equipe de pesquisadores da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, coordenada pelo professor Célio Lopes Silva.

Num projeto temático com financiamento da FAPESP em torno de R$ 600 mil, e depois de vários anos de estudos e experimentação meticulosa, os pesquisadores desenvolveram uma vacina de DNA, considerada de terceira geração, que poderá ser aplicada no controle da tuberculose, caso seja comprovada em humanos a mesma eficiência já atestada em animais.

Segundo Célio Silva, o trabalho começou em 1990, quando ele foi para Londres fazer seu pós-doutoramento. Naquela época, já se sabia que a BCG (Bacilo Calmette-Guérin), uma vacina viva baseada no *Mycobacterium bovis* atenuada para uso humano em 1921 (vacina de primeira geração), não conferia proteção satisfatória contra a tuberculose. Os antígenos purificados da BCG (vacinas de segunda geração) também não induziam a proteção tanto desejada.

"Uma série de dificuldades impedia os estudos para desenvolver uma nova vacina", relata o pesquisador. Partindo-se do princípio de que o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, se esconde dentro das células humanas e não é atingido pela ação dos anticorpos, seria necessário estimular os linfócitos T CD8, capazes de destruir especificamente as células infectadas pelos bacilos. Esses linfócitos são estimulados somente quando os antígenos são produzidos dentro de células, como acontece nas infecções virais.

Vacina gênica

"Esse princípio foi o ponto de partida para iniciar o projeto", afirma Célio Silva. Foi tomado um pedaço de DNA (o código genético contendo a mensagem para a célula fazer o antígeno) e inserido num retrovírus fabricado em laboratório pelas técnicas de engenharia genética. As células (macrófagos) infectadas com esse retrovírus recombinante sintetizaram os antígenos, estimularam os linfócitos T CD4 e T CD8 e induziram proteção contra infecção por *M. tuberculosis*. "O delineamento experimental para fazer a vacina estava estabelecido", declara o pesquisador. De volta para Ribeirão Preto, Célio Silva não mediu esforços para arranjar um sistema mais prático e seguro para fabricar os antígenos dentro das células, uma vez que o processo de infecção com retrovírus era mais um fator de risco para a saúde da população. Por sorte os primeiros experimentos com vacinas gênicas estavam se iniciando em diversas partes do mundo.

FOTO GABRIELLA ZAUITH

Célio Lopes Silva: entre um terço e metade da população munidal está infectada com o bacilo da tuberculose

A vacina de DNA, ou vacina gênica, que está revolucionando o campo, é baseada num pedaço do código genético do agente causador da doença. "Aplicado por meio de injeção intramuscular, esse DNA cria condições para a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado", segundo Célio Lopes Silva e colaboradores em trabalhos publicados em várias revistas internacionais.

"As vacinas de organismos vivos e atenuados, embora funcionem muito bem para certas doenças, oferecem certa margem de risco de que a pessoa acabe contaminada pela doença que se pretende prevenir", afirmam os autores. "Com a vacina de DNA isso não acontece." Dessa forma, a vacina gênica é hoje a maior esperança para o combate a doenças infecciosas para as quais ainda não se tem prevenção segura, como herpes, Aids, malária, hepatite, esquistossomose, dengue e tuberculose.

Primeiros resultados

Os primeiros resultados positivos da vacina gênica brasileira contra tuberculose foram apresentados em 1994, em Genebra, numa reunião da Organização Mundial da Saúde (OMS) específica sobre tuberculose, e, desde então, os experimentos foram ampliados. De acordo com os dados da época, camundongos foram vacinados durante três meses com quatro doses de 50 microgramas de DNA por via intramuscular. Após duas semanas, foram infectados com o agente etiológico da doença, o *Mycobacterium tuberculosis*.

O grupo que não estava vacinado registrou a presença de cerca de 1.200.000 bactérias por grama de tecido, enquanto o vacina-

do oscilou de zero a 100 ou 1.000 bactérias — um número considerado excelente.

Depois de 1994, os pesquisadores passaram a testar DNAs que codificassem antígenos diferentes, com o propósito de verificar o melhor para a vacina. Já foram testados 12 antígenos desde então, suficientes para a equipe se dar por satisfeita. Trata-se de um trabalho extremamente delicado e que leva de seis a oito meses para cada antígeno.

Do ponto de vista científico, a revelação dos brasileiros no encontro de 1994 representou um enorme êxito. "Com a apresentação dos resultados positivos, vários grupos de biotecnologia avançada se animaram a prosseguir as pesquisas na mesma direção", afirma Célio Silva. Nos Estados Unidos, diversos laboratórios estão envolvidos em projeto semelhante, com um orçamento estimado em US$ 800 milhões.

O próximo passo seria experimentar a vacina em outros modelos animais, como cobaias, coelhos e macacos. Depois desses experimentos, a vacina poderia ser testada em humanos em três fases distintas. Na fase 1 (utilizando mais ou menos 50 indivíduos) seria verificada a toxicidade; na fase 2 (em torno de 300 indivíduos) seriam observados os efeitos imunológicos; e na fase 3 (com cerca de pelo menos 150.000 pessoas) seria verificada a eficiência da vacina numa determinada população, acompanhada por pelo menos 12 anos. Ao todo, esse processo poderia levar até 20 anos e os custos para a realização de todos os testes seriam elevados.

Mudança de alvo

Apesar dos bons resultados obtidos pelo grupo coordenado por Célio Silva, as dificuldades acima apresentadas fizeram com que o grupo mudasse o seu alvo para o combate à tuberculose. "Em vez de usar a vacina de DNA como preventiva da infecção, direcionamos os trabalhos visando ao uso dessa mesma vacina no combate direto à infecção já estabelecida, como se fosse um agente terapêutico ou uma droga antimicobacteriana" diz o pesquisador.

Reforçou essa posição o fato de entre um terço e metade da população mundial já estar infectada com o bacilo da tuberculose. Em torno de 5% a 10% desses indivíduos desenvolvem a doença. Nessas condições, o uso de uma vacina não como preventiva da infecção mas que tenha atividade terapêutica contra indivíduos infectados seria a solução.

Os resultados obtidos pelo grupo mostraram que a administração da vacina gênica em animais previamente infectados com *M. tuberculosis* virulenta previne o desenvolvimento da doença e elimina a infecção. Além disso, quando a vacina é administrada em estados mais avançados da doença, ou mesmo quando ela está disseminada por todo o organismo do animal, ela também tem a propriedade de curá-los. Essa cura se dá pela ativação apropriada do sistema imunitário.

Um dos problemas mais sérios relacionados com o controle da tuberculose é o aparecimento de bacilos que apresentam resistência a vários dos medicamentos utilizados no tratamento, como a isoniazida, pirazinamida, estreptomicina e rifampicina, entre outros. Já foram isolados bacilos que são resistentes não só contra um desses medicamentos como também contra combinações de dois, três e mesmo contra todos ao mesmo tempo. Esses pacientes, denominados multidroga resistentes, contam com poucas alternativas de tratamento e às vezes com nenhuma. O desenvolvimento do projeto mostrou que animais infectados com bacilos resistentes a essas drogas também são curados pela administração da vacina gênica.

Outro problema associado ao alto índice de indivíduos infectados se correlaciona com o alto grau de adaptação dos bacilos ao homem. A infecção normalmente se estabelece após inalação dos bacilos e sua entrada nas células de defesa do nosso organismo. Dentro dos macrófagos, que são células com alto potencial microbicida, os bacilos têm a habilidade de desativar os sistemas de defesa dessas células e conseguem sobreviver e se multiplicar no seu interior. O sistema de defesa imunitário do homem toma conhecimento da presença dos bacilos e estabelece uma resposta contra eles, caracterizada por uma reação inflamatória crônica denominada granuloma e que tem a finalidade de circunscrever e delimitar a infecção.

Nessas condições, os bacilos podem sobreviver por anos em estado de latência ou dormência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença. A doença se manifesta quando há um desequilíbrio dessa relação

FOTO GABRIELLA ZAUITH

A vacina é baseada num pedaço do código genético do bacilo

mútua e freqüentemente está associada com estados de depressão da resposta imunológica. Os casos mais comuns de imunossupressão associados com a tuberculose são os indivíduos com Aids, estressados, que tomam drogas imunossupressoras, alcoólatras e desnutridos, entre outros.

Experimentos

No desenvolvimento do projeto também foi olhado com muita atenção esse problema do estado de latência ou dormência das micobactérias que podem sofrer uma reativação e manifestar a doença em estados de imunossupressão. Foi desenvolvido um modelo experimental em camundongos que mimetiza exatamente as condições observadas no desenvolvimento da doença humana em imunodeprimidos. Nos grupos de animais controles – aqueles que foram infectados, tratados com drogas antibacterianas para estabelecer um estado de latência, a quem foi administrado corticosteróide para causar imunossupressão e que não foram vacinados – observou-se a reativação da infecção e o estabelecimento da doença. Nos grupos experimentais que

Koch e a tuberculose

A infecção pelo bacilo da tuberculose se dá pela inalação de pequenas gotículas oriundas do espirro de pessoas contaminadas. Essas gotículas contendo bacilos vão para os pulmões e aí, dependendo do estado de resistência imunitária dos indivíduos, podem estabelecer a doença. O pulmão é, em geral, o órgão mais comprometido pela infecção da tuberculose.

A tuberculose é conhecida desde o Egito antigo, séculos antes de Koch ter descoberto o bacilo que hoje leva o seu nome e que lhe proporcionou o Prêmio Nobel de Medicina em 1905.

Apesar de a tuberculose ser muito antiga, o conhecimento sobre os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da doença é pouco entendido. Não se sabe ao certo como se estabelecem as relações quando os bacilos penetram e se multiplicam dentro das células dos indivíduos. Além disso, muitos estudos ainda são necessários para melhorar os testes de diagnóstico, descobrir novas drogas antibacterianas e desenvolver uma vacina mais eficiente para impedir a transmissão da doença.

foram vacinados com a vacina de DNA não foram observadas reativações e desenvolvimento da doença, principalmente quando foram administradas três doses da vacina. "Se a vacina em humanos funcionar da mesma maneira como foi demonstrado para os animais ela pode até erradicar a tuberculose em nosso meio", afirma o pesquisador.

Teste em humanos

O tratamento da tuberculose feito com drogas antimicobacterianas é de longa duração — demora pelo menos seis meses. O uso contínuo dessas drogas, que normalmente são tóxicas para os pacientes, leva a uma alta taxa de abandono de tratamento e tem reflexos importantes no controle da doença e aparecimento de bacilos resistentes. O uso concomitante da vacina de DNA com drogas antibacterianas permitiu uma redução significativa do período de tratamento dos animais infectados com *M. tuberculosis*. Isso poderá trazer ganhos significativos, tanto no bem-estar social dos doentes e infectados quanto nos aspectos econômicos envolvidos no controle da tuberculose.

O próximo passo, agora, e essa é a grande novidade da equipe de Ribeirão Preto, será testar a atividade terapêutica da vacina em um grupo de pacientes que manifestam a doença e cujas bactérias são resistentes a todas as drogas existentes no mercado. Esse grupo será chamado de "resistente a multidrogas". Ao mesmo tempo, outro grupo "normal" (que responde às drogas) será estimulado pela vacina, simultaneamente à administração de drogas, com a finalidade de verificar se o tempo de tratamento é encurtado. Ambos os testes serão desenvolvidos com o apoio da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e controlados por equipes treinadas no Departamento de Moléstias Infecciosas.

Os dados científicos obtidos até o momento são tão animadores que a revista *Nature* acaba de aceitar a publicação de trabalho do grupo sobre a terapia gênica contra a tuberculose, o que deverá ocorrer proximamente, provavelmente causando repercussão nos meios científicos em todo o mundo. Não é para menos. A tuberculose é um dos mais graves problemas de saúde pública do planeta, especialmente nos países pobres. O bacilo é responsável pela morte de cerca de 3 milhões de pessoas por ano. Por isso ela é classificada como "reemergente".

No Brasil, cerca de 90 mil novos casos são notificados a cada ano, juntamente com 5 mil mortes. Os principais focos, como no Rio de Janeiro e São Paulo, estão associados a hábitos e condições de vida, promiscuidade e consumo de drogas. O aparecimento da infecção pelo HIV tornou a tuberculose uma doença ainda mais dramática, devido à associação com a Aids.

Pelo menos nas pesquisas com os camundongos, a vacina gênica foi utilizada no tratamento da doença, conceito diferente em relação às vacinas convencionais, que são utilizadas somente como prevenção à instalação da doença. "A vacina de DNA cura a infecção, cura a doença estabelecida e impede que ocorra a reativação da doença, sem perder a sua característica profilática", afirma Célio Silva. "Se der certo no homem, será uma arma poderosa contra a tuberculose."

Para a ciência, cuja escala de tempo prevê resultados a médio e longo prazo, vale a pena investir, diante dos benefícios que podem advir. Não é algo que se possa esperar para antes do ano 2001, segundo Célio Silva. "Mas nesse período não haverá droga ou vacina que sairá em hipótese alguma", afirma. "Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento dessa vacina com atividade terapêutica contra a tuberculose são inúmeros", afirma o cientista. "Ela é segura, eficaz, pode ser dada numa única dose, estimula amplamente a resposta imunológica, tem efeito protetor duradouro e pode contribuir significativamente para a diminuição da incidência da tuberculose", acrescenta.

O custo de produção em larga escala é baixo e são estáveis à temperatura ambiente. Todos esses fatores "facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso e absolutamente desejáveis no âmbito da realidade brasileira".

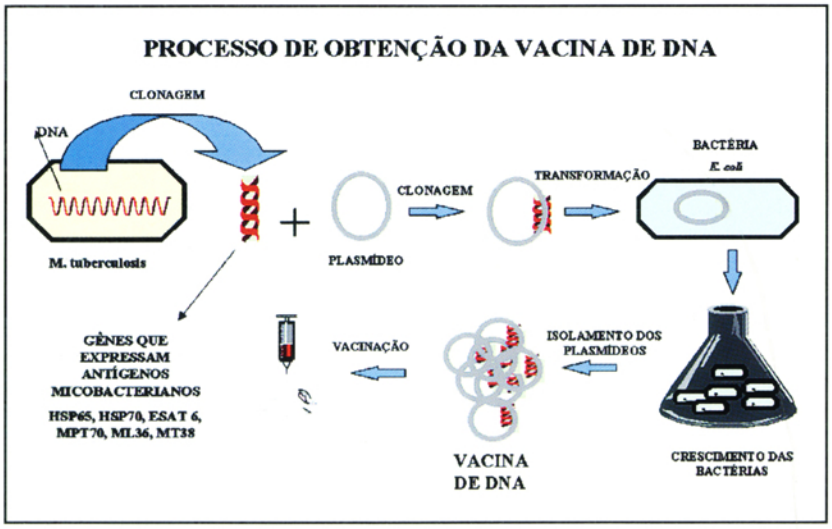
Vantagens da vacina gênica

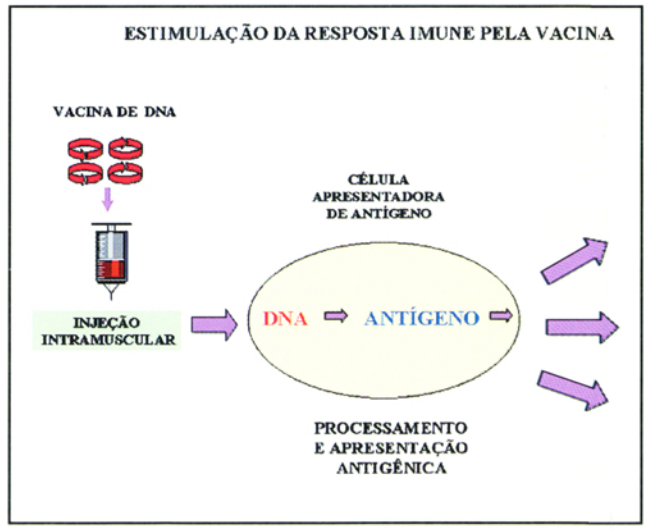
O que a vacina de DNA permite, segundo o cientista Célio Silva:

- Previne o estabelecimento da infecção e da doença
- Elimina a infecção causada pelo bacilo da tuberculose
- Cura casos crônicos e doença disseminada
- Resolve casos de tuberculose causada por bactérias altamente resistentes aos medicamentos usados no combate à doença
- Impede a reativação da doença quando os animais são submetidos a uma imunodepressão pelo tratamento com drogas imunossupressoras
- Permite que o período de tratamento efetivo contra a tuberculose seja encurtado de oito para dois meses pela administração concomitante de medicamentos e aplicação da vacina

O processo de obtenção da vacina

Para a produção da vacina, um pedaço da molécula de DNA do bacilo é retirado e inserido em plasmídeos especiais que permitem a sua multiplicação em larga escala em bactérias *Escherichia coli*. No DNA fica o código genético que codifica um antígeno o qual tem a potencialidade de induzir uma resposta imune "adequada, protetora e duradoura", segundo Célio Silva. Quando aplicada em animais, a vacina de DNA induz a produção da proteína antigênica dentro de células do sistema imunológico, como os macrófagos e as células dendríticas. Essas células são conhecidas como células apresentadoras de an-





tígenos e estão diretamente relacionadas com a estimulação da produção de anticorpos e ativação de linfócitos T. Os linfócitos T são fundamentais para o controle da tuberculose.

Diversos segmentos de DNA já foram testados e alguns deles oferecem proteção de 100% em animais infectados, sendo que em vacinas recombinantes, da segunda geração, o índice de proteção alcançado foi de 10 a 15%. As análises imunológicas mostraram que, dentre todas as células estimuladas pela vacina de DNA, os linfócitos T CD8 exercem papel preponderante no controle da infecção.

Os trabalhos do grupo de Ribeirão Preto mostraram que os linfócitos T CD8 estimulados pela vacina gênica são preferencialmente do tipo citotóxicos, isto é, têm tanto a capacidade de destruir as células que albergam o bacilo da tuberculose em seu interior como secretam grânulos enzimáticos que ajudam na sua eliminação. Além disso, tanto os linfócitos T CD8 como os T CD4 secretam, em altas concentrações, os estimuladores do sistema imunológico (interleucinas), como a IL-2, IL-12 e interferon gama. As interleucinas ajudam a manter ativados os sistemas microbicidas dos macrófagos, que também são usados para matar as micobactérias.

A imunidade adquirida persiste por longo período de tempo, devido tanto à constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira como à capacidade destes estimularem linfócitos de memória imunológica, sendo desnecessárias as revacinações.

A vacina de DNA, segundo Célio Silva, é um método considerado "mais eficaz e seguro" do que o de vacinas convencionais, que inoculam vírus ou bactérias atenuadas na pessoa para obrigar o sistema imunológico a produzir anticorpos ou imunidade celular. Com a vacina de DNA não existe o risco de que a pessoa termine contaminada, ao contrário da vacina de organismos vivos como o BCG — e essa é apenas uma de suas vantagens. "As vacinas de DNA representam uma metodologia que se aproxima da infecção natural, alcançando altos níveis de proteção desejada", segundo relata Célio Silva em seu trabalho.

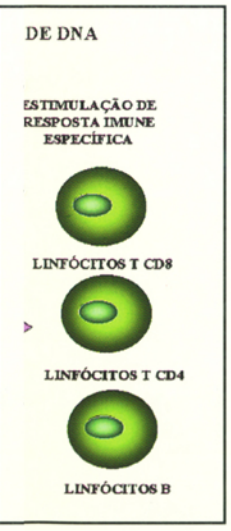
A vacina gênica é uma alternativa relativamente recente na ciência médica. Somente em 1992 é que foi demonstrado pela primeira vez que um gene associado a um plasmídeo poderia ser empregado como vacina, de acordo com a literatura médica. Logo após foi mostrado que a injeção intramuscular do gene que codifica uma nucleoproteína do vírus influenza poderia ser utilizada para imunização de camundongos contra essa virose.

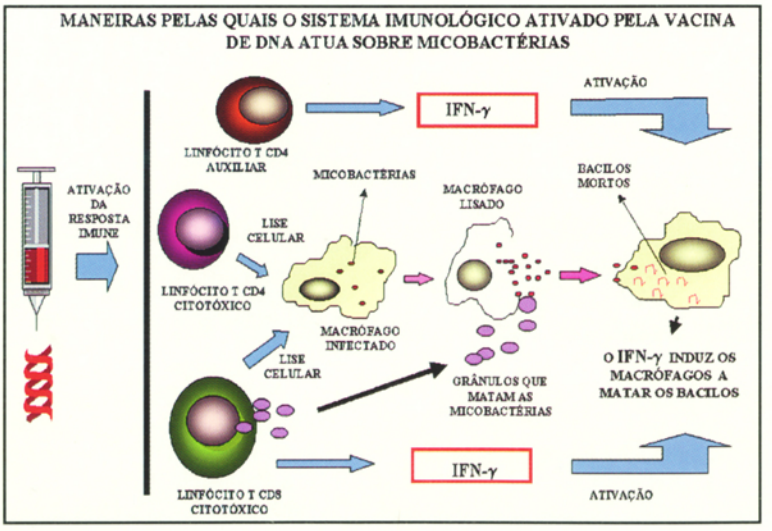
O fato causou enorme repercussão nos meios científicos e tecnológicos, segundo Célio Silva. "Desde então foram desenvolvidas vacinas gênicas contra uma série de agentes patogênicos. E algumas dessas novas vacinas, principalmente aquelas contra Aids e influenza, apresentaram excelente resposta em primatas, e já se encontram em fase de testes pré-clínicos em humanos", segundo ele.

A equipe de pesquisa da terapia gênica contra tuberculose é composta por Célio Lopes Silva, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (coordenador); Lúcia Helena Faccioli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP; Sylvia Cardoso Leão, da Universidade Federal de São Paulo - Unifesp; Douglas B. Lowrie, do National Institute for Medicial Research, Londres; e José Maciel Rodrigues Junior, da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais.

Perfil:

O professor Célio Lopes Silva, 46 anos, é farmacêutico, graduado pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) em 1976. Fez mestrado e doutorado na área de Bioquímica do Instituto de Química da USP, livre-docência em Microbiologia Médica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e pós-doutoramento em Imunologia e Biologia Molecular no National Institute for Medical Research, na Inglaterra, entre 1989 e 1990. É professor titular em Imunologia e foi chefe do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP entre 1995 e 1998.





Laboratório poderá servir a experimentos semelhantes

Laboratório especial

Em ciência, o investimento feito em função de uma pesquisa pode servir para muitas outras. É o caso do Laboratório de Vacinas Gênicas, construído com recursos da FAPESP no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O laboratório permite a manipulação com segurança de microrganismos que causem doenças sérias e potencialmente letais por exposição ou inalação. Foi edificado para a pesquisa da vacina contra a tuberculose, mas poderá servir para outros experimentos equivalentes.

Esse investimento foi necessário, pois não havia em Ribeirão Preto laboratório com o grau de segurança necessário para uma pesquisa como essa. Conceitualmente, o Laboratório de Vacinas Gênicas, cujo nível de biossegurança é 3 (NB3), é considerado adequado para trabalhos com organismos geneticamente manipulados (OGM) resultantes de agentes altamente infecciosos classe 3, como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis*.

Graças a esse recurso, todos os trabalhos com o bacilo da tuberculose são realizados em cabines de segurança biológica classe III. Elas permitem manipulação de culturas de células infectadas e de material clínico contaminado, cultura de microrganismos, operações de animais, cultivo de tecidos ou fluidos infectados de animais e necrópsia.

De acordo com Célio Silva, o pessoal de laboratório tem treinamento específico no manejo desses agentes patogênicos e potencialmente letais e é freqüentemente supervisionado por especialistas com vasta experiência com esses agentes.