

Um bacilo muito agressivo

Contenção temporária: bacilo da tuberculose engolfado por um macrófago



Bactérias hipervirulentas da tuberculose causam morte explosiva de células de defesa e aceleram sua disseminação

Ricardo Zorzetto

Um freezer com temperaturas bastante baixas, 70 graus negativos, guarda amostras congeladas do microrganismo causador de uma das doenças mais antigas de que se tem registro na humanidade, a tuberculose. Trancado em uma sala de acesso restrito na Universidade Estadual do Norte Fluminense (Uenf), no município de Campos, no Rio de Janeiro, esse freezer abriga dezenas de tubos com bactérias da tuberculose coletadas em diferentes regiões do Brasil e em outros países – algumas delas classificadas como das mais agressivas em expansão em certas regiões do mundo. O acesso a essa sala do laboratório de biossegurança da Uenf é rigorosamente controlado pela imunologista russa Elena Lassounskaia. “Só seis ou sete pessoas bem treinadas têm autorização para entrar ali e trabalhar”, conta a pesquisadora, que nasceu em São Petersburgo e há 20 anos trabalha na Uenf, onde coordena os estudos sobre a agressividade da bactéria da tuberculose.

Experimentos feitos em seu laboratório, em colaboração com outras equipes de São Paulo e do Rio, começam a gerar uma nova compreensão de como as cepas mais agressivas do bacilo da tuberculose, em parte dos casos, vencem as células de defesa que deveriam controlá-lo e se espalham rapidamente pelo corpo, causando danos graves nos pulmões e em outros órgãos. Numa explicação simplificada, o que as variedades mais agressivas ou hipervirulentas da bactéria fazem é crescer mais rápido em células de defesa do pulmão e destruí-las, aumentando a liberação de compostos químicos que sinalizam para o sistema imune a ocorrência de dano celular, mostram os pesquisadores em artigo publicado em julho na *PLoS Pathogens*. Em resumo, essas bactérias intensificam a liberação de sinais de perigo, exacerbando a inflamação pulmonar.

Em muitas infecções e também em inflamações causadas por pequenos danos, como uma pancada na perna, esse alerta é saudável e até desejável. Ele desperta a atenção de outras células de

defesa e as encaminha para a região onde surgiu o problema. As novas células convocadas englobam e digerem a célula morta, infectada ou danificada que enviou o alerta químico, resolvendo o problema. Em caso de microrganismos mais persistentes, como as micobactérias – que incluem os bacilos da tuberculose humana (*Mycobacterium tuberculosis*) e bovina (*M. bovis*) e da hanseníase (*M. leprae*) –, o sistema imune tem dificuldade de eliminar completamente as bactérias e mantê-las por anos em uma área restrita, formando uma barreira de células de defesa em volta das células infectadas, o granuloma.

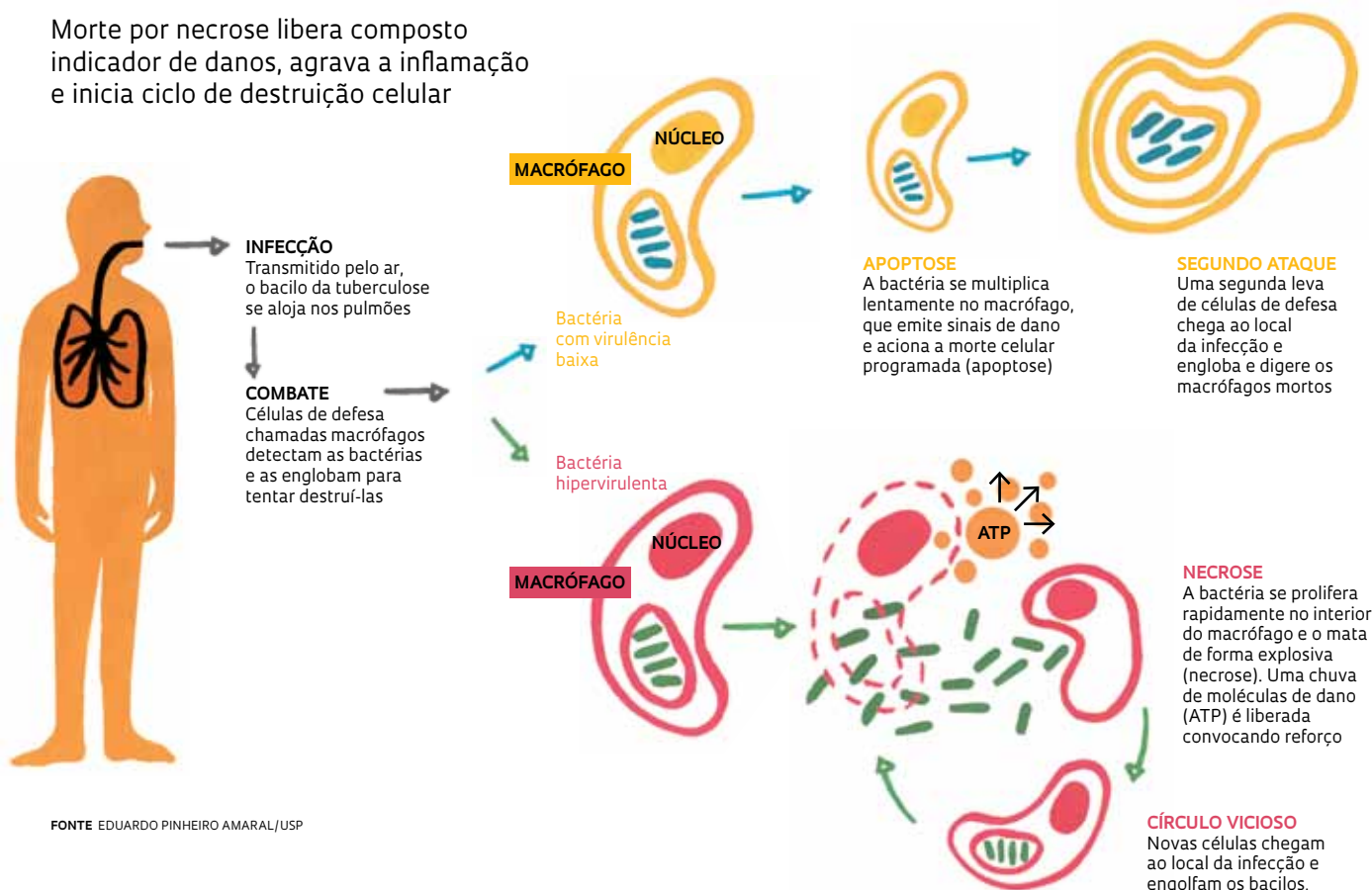
Com as micobactérias hipervirulentas ou em pacientes com imunodeficiência, porém, o cenário muda. Dois anos atrás um grupo liderado por Roland Brosch e Jost Enninga, do Instituto Pasteur, em Paris, demonstrou que micobactérias virulentas conseguiam romper a bolsa em que são mantidas no interior dos macrófagos, as células de defesa que detectam e englobam partículas e microrganismos estranhos ao corpo. A ruptura dessa bolsa de contenção chamada fagossomo desencadeia uma forma violenta de morte – a necrose – em que o macrófago explode e espalha o seu conteúdo pela vizinhança.

Essa morte estrondosa lança no tecido uma chuva de sinalizadores de dano celular. Eles funcionam como fogos de artifício que indicam perigo e atraem mais células de defesa para a região do dano inicial. Mas o excesso desses sinalizadores – um deles em especial, a molécula de trifosfato de adenosina (ATP) – amplia o problema: inicia um círculo vicioso de infecção e destruição de macrófagos, revelaram os pesquisadores de São Paulo e do Rio no artigo da *PLoS Pathogens* (ver infográfico na página 40).

“Em baixas concentrações no tecido, o ATP funciona como um ativador das células do sistema imune”, explica a imunologista Maria Regina D’Império Lima, da Universidade de São Paulo (USP), uma das coordenadoras do estudo, do qual participaram pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo

Chuva de sinalizadores químicos

Morte por necrose libera composto indicador de danos, agrava a inflamação e inicia ciclo de destruição celular



FONTE EDUARDO PINHEIRO AMARAL/USP

(Unifesp) e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Nessa situação, formam-se estreitos canais na membrana das células de defesa que permitem a troca de íons com o meio externo e as ativam. Já em concentrações elevadas, o ATP induz o surgimento de grandes poros que deixam sair moléculas inflamatórias, além de disparar a morte por necrose.

O biólogo Eduardo Pinheiro Amaral, aluno de doutorado de Maria Regina, comprovou que, ao matar os macrófagos por necrose, as cepas hipervirulentas de *Mycobacterium* conseguem escapar vivas e infectar mais macrófagos, induzindo a inflamação exacerbada do pulmão. Amaral foi um dos primeiros alunos treinados para trabalhar com micobactérias no laboratório de biossegurança nível 3 da Uenf já na iniciação científica, quando estabeleceu um modelo de infecção em camundongos para avaliar a virulência de micobactérias não tuberculosas. No mestrado, ele se concentrou em micobactérias tuberculosas mais agressivas, no laboratório de biossegurança coordenado por Mario Hirata na USP. Amaral fez uma ponte rodoviária entre São Paulo e Campos durante cerca de um ano para realizar experimentos nos dois laboratórios e

avaliar uma variedade maior de bactérias isoladas de pessoas e vacas com tuberculose.

Um dos grupos de bactérias da tuberculose estudados por Amaral pertence à família genética Beijing. “Originária da China, essa família de micobactérias é bastante agressiva e vem se disseminando mais rapidamente do que outras”, conta Elena. “Essa já é a cepa predominante na Rússia e em países da antiga União Soviética e apresenta mais resistência a vários medicamentos usados no tratamento da tuberculose.” Na América Latina e na Europa mediterrânea, as cepas mais comuns são de outra família de *M. tuberculosis*, a Latin American-Mediterranean, em que são relativamente raros os casos de resistência às drogas.

Mesmo assim, a tuberculose no Brasil e no mundo continua um desafio de saúde pública. Calcula-se que 2 bilhões de pessoas estejam infectados com o bacilo da tuberculose, que na imensa maioria dos casos permanece em estágio dormente, do qual só desperta quando o nível de imunidade do organismo se torna baixo demais – em situações de estresse físico ou psicológico ou infecção por HIV. Uma estimativa recente, publicada em 22 de julho na *Lancet*, mostra que o número de pessoas com tuberculose aumentou quase 40% em pouco mais de 20 anos: subiu de

8,5 milhões em 1990 para 12 milhões em 2013, embora o número de mortes tenha baixado 12,5%, de 1,6 milhão em 2000 para 1,4 milhão em 2013. No Brasil, segundo esse estudo, houve 108 mil novos casos e quase 6 mil mortes em 2013. “A partir de 2001, o programa de controle da tuberculose implementado no país parece ter contribuído para reduzir a proporção de casos novos de 43 em cada 100 mil habitantes em 2001 para os atuais 36 por 100 mil”, conta Elena. “O controle está melhorando, mas o problema não está resolvido.”

Amaral identificou o padrão distinto de ativação dos sinais de dano do sistema imune ao trabalhar com três variedades de bactéria da tuberculose. Ele testou duas bactérias hipervirulentas: a cepa Beijing de *M. tuberculosis* isolada de um paciente russo e uma cepa de *M. bovis* encontrada em um surto da tuberculose bovina no Sul do Brasil – embora afete preferencialmente o gado, essa variedade pode causar tuberculose em humanos. As duas cepas se multiplicaram mais rapidamente nas células de defesa *in vitro* e nos animais infectados do que a terceira bactéria, uma cepa de *M. tuberculosis* usada como referência em laboratórios.

Bastaram 100 bactérias das cepas mais agressivas para iniciar uma infecção pulmonar capaz de matar. A cepa Beijing matou 90% dos roedores em oito meses, enquanto a *M. bovis* eliminou todos os animais em 40 dias. Os camundongos contaminados com a cepa de padrão de virulência sobreviveram até o fim do experimento. A capacidade de proliferação das bactérias mais agressivas e o nível de inflamação que causavam (atraindo mais células de defesa) foram tão elevados que deixaram os pulmões dos roedores com uma massa de três a cinco vezes superior à normal em apenas um mês. A morte dos macrófagos e o recrutamento de mais células de defesa para a área infectada destroem o tecido pulmonar e obstruem os alvéolos, causando falta de ar e tosse com eliminação de sangue.

Mycobacterium tuberculosis em secreção de paciente com tuberculose



O papel do ATP nessa inflamação exacerbada se tornou evidente quando os pesquisadores realizaram os mesmos testes com camundongos geneticamente modificados para não apresentar na superfície das células de defesa uma proteína – o receptor P2X7 – que reconhece o ATP e as coloca em ação. O grau de necrose dos macrófagos e de inflamação nos roedores sem P2X7 foi bem menor do que nos normais. “Esse resultado responde a uma questão importante sobre a resposta imunológica ao bacilo da tuberculose”, conta Maria Regina, que começou a notar a importância desse receptor na morte de macrófagos por necrose em experimentos com animais com malária.

Além de ajudar a compreender como as bactérias mais agressivas agem, esses resultados abrem a perspectiva de que se possa intervir de modo mais eficiente no combate à tuberculose. “Se conseguirmos controlar a inflamação por meio de compostos que bloqueiem a ativação do receptor P2X7, talvez seja possível ganhar um tempo importante para o tratamento dos pacientes mais graves”, diz Eduardo. Nos testes com as cepas mais agressivas, os camundongos sem essa proteína viveram de 60 a 110 dias a mais do que os roedores normais. “O controle da inflamação com compostos que ajam no P2X7 não elimina a bactéria, mas pode diminuir lesões nos tecidos e dar mais tempo para os antibióticos agirem”, completa. Alguns compostos que atuam sobre o P2X7 estão sendo testados em animais e seres humanos. Caso seja viável, essa estratégia complementar pode ajudar a melhorar o tratamento das formas agressivas da tuberculose, que hoje dura ao menos seis meses e exige o uso de quatro antibióticos diferentes.

Na Uenf, a equipe de Elena e pesquisadores da UFRJ avaliam a ação de compostos produzidos por plantas sobre o crescimento da micobactéria e a superinflamação disparada pelas bactérias hipervirulentas de tuberculose. Hoje se usam anti-inflamatórios tradicionais nos casos em que a tuberculose atinge o sistema nervoso central. Mas esta pode não ser a melhor alternativa sempre. “Usar anti-inflamatórios com mecanismos de ação diferentes do convencional, em combinação com antibióticos”, conta Elena, “parece ser o futuro da terapia para os casos mais graves de tuberculose”. ■

Projeto

Papel dos inflamassomas na patogenia da tuberculose causada por isolados clínicos hipervirulentos de micobactérias (nº 13/07140-2); Modalidade Auxílio Regular a Projeto de Pesquisa; Pesquisadora responsável Maria Regina D'Império Lima – ICB/USP; Investimento R\$ 288.936,14 (FAPESP).

Artigos científicos

AMARAL, E. P. *et al.* Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathogens*. 3 jul. 2014.

MURRAY, C. J. *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*. 22 jul. 2014.