



Genoma à brasileira

Catarina Chagas



Leila Mendonça e Castello Branco coordenaram a equipe que fez o seqüenciamento da bactéria utilizada como vacina contra a tuberculose





Fiocruz e a Fundação Ataulpho de Paiva (FAP) anunciaram a conclusão de uma importante pesquisa para a área de saúde pública, o seqüenciamento do genoma completo do *BCG Moreau RDJ*, cepa usada na vacina aplicada no Brasil contra a tuberculose. A partir do estudo, que levou três anos para ser concluído, será possível aumentar a eficácia do imunizante, diminuir seus efeitos colaterais e ampliar o controle de qualidade nos processos de produção.

Nos últimos anos, cresceu muito o conhecimento dos cientistas sobre o genoma de bactérias semelhantes à *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose. A partir de técnicas moleculares e genômicas, associadas a um extenso levantamento histórico, os especialistas puderam estabelecer uma genealogia das diferentes cepas de BCG (bacilo de Calmette e Guérin) e identificar fatores que interferem em sua capacidade protetora contra a doença.

“Estudos anteriores demonstraram que, quando comparados ao genoma completo de *M. tuberculosis*, cerca de 129 genes estão ausentes do genoma de várias cepas de BCG”, conta uma das coordenadoras do projeto, a farmacêutica Leila Mendonça Lima, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz. “No entanto, esses trabalhos, embora valiosos, não são capazes de identificar alterações mais sutis entre as diferentes cepas – como mutações pontuais ou pequenas deleções e inserções –, acessíveis apenas através do seqüenciamento completo do genoma”.

Ainda segundo Lima, mesmo mutações pontuais podem influenciar na variação da capacidade vacinal do BCG. “Isso ficou claro nas cepas derivadas a partir de 1927, por exemplo, que perderam a capacidade de síntese de ácidos metoximicólicos, um tipo

de ácido micólico que integra a parede celular das micobactérias, por causa da mutação de um único nucleotídeo, o que pode estar associado a um decréscimo na sua virulência”.

Além disso, a variação da capacidade protetora do BCG observada nos diferentes ensaios clínicos realizados não se deve unicamente à cepa de BCG utilizada: alguns estudos demonstraram resultados contraditórios em casos de utilização da mesma cepa em diferentes países. Portanto, pode-se concluir que outros fatores desempenham papel importante na qualidade das vacinas, como a preparação da mesma, as características genéticas da população a ser imunizada e o padrão prévio de infecção por outras micobactérias comuns no meio ambiente.

Com o seqüenciamento completo do genoma do BCG Moreau-RDJ, os pesquisadores terão um conheci-

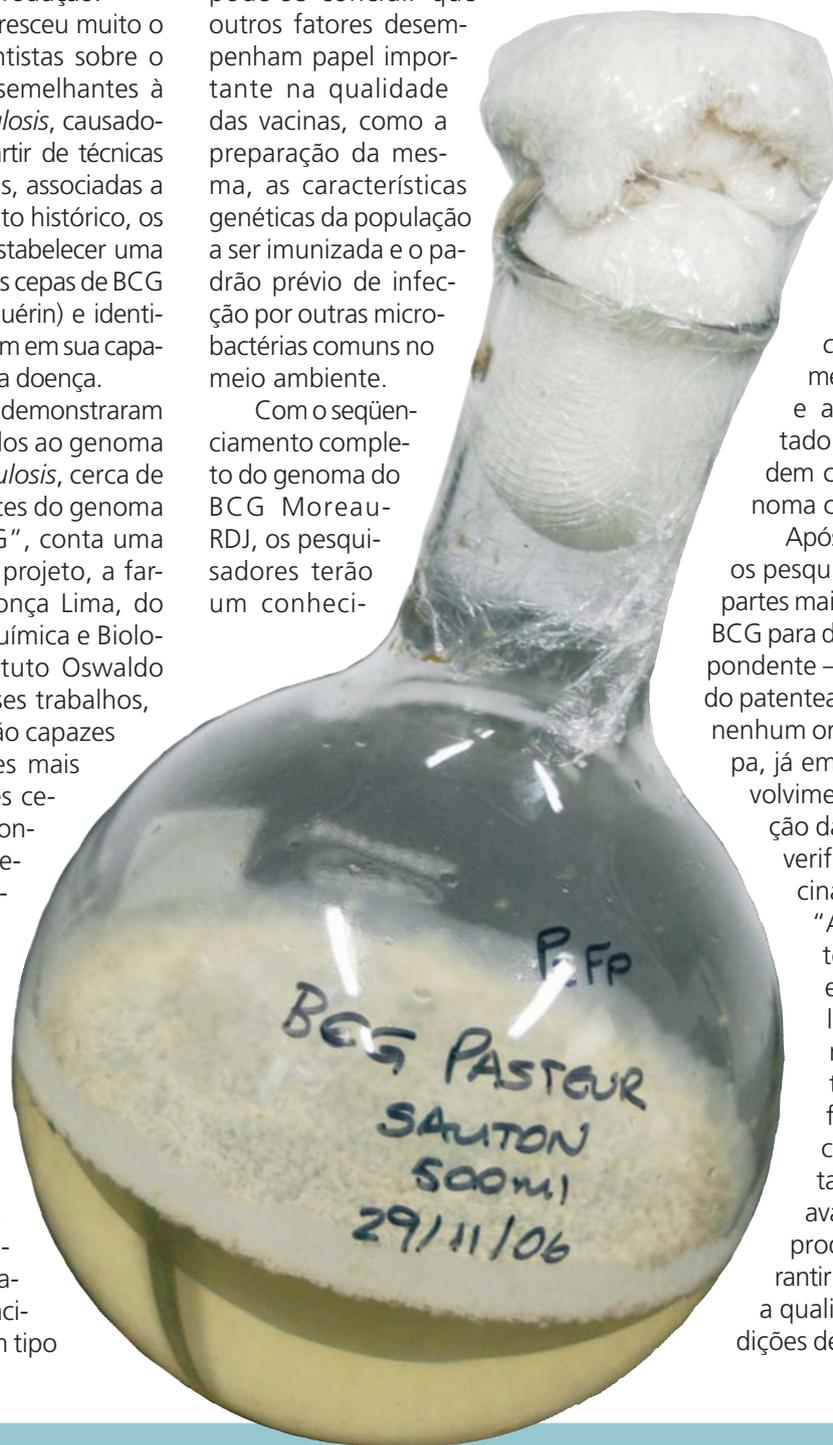
mento detalhado sobre esta cepa vacinal, incluindo aspectos de sua evolução, características de virulência e sobrevivência. Tudo isso proporcionará informações suficientes para aperfeiçoar a vacina e aumentar sua segurança.

Vacina ficará mais segura

O trabalho começou em 2004, com a construção de duas bibliotecas genômicas. Nessa etapa, a partir da cultura de BCG Moreau-RDJ fornecida pela FAP e originada em 1930, os pesquisadores extraíram o DNA do bacilo e dividiram-no em pedaços menores que foram inseridos em plasmídeos (moléculas de DNA circular) para serem clonados em bactérias (*E. coli*). Em seguida, os fragmentos foram seqüenciados e analisados em computadores para colocá-los na ordem correta, até formar o genoma completo da cepa.

Após a conclusão do trabalho, os pesquisadores selecionaram as partes mais importantes do DNA do BCG para depositar a patente correspondente – no Brasil, não é permitido patentear o genoma completo de nenhum organismo. A próxima etapa, já em andamento, é o desenvolvimento de um *kit* de avaliação da qualidade, por meio da verificação genética, das vacinas atualmente utilizadas.

“As formas de controle que temos hoje, embora eficientes, são caras e trabalhosas”, alerta Lima. “O novo método, a partir da tecnologia molecular, vai facilitar e baratear o processo”. Será possível, portanto, criar mecanismos de avaliação genômica do BCG produzido que permitirão garantir a estabilidade genética e a qualidade em diferentes condições de produção e estocagem.





HYBRIDIZATION
INCUBATOR

ACETONE
BAKER
FW 412

CON

FILTER TIP
1000 (C)



A fase laboratorial do desenvolvimento do *kit* de controle deve estar pronta ainda em 2007. Em seguida, os pesquisadores estudarão a validação dos *kits* para torná-los seguros em práticas rotineiras, evitando falsos-positivos e outras imprecisões. Por fim, a tecnologia será transferida para a FAP, que poderá usá-la no controle de qualidade da produção da vacina.

Além do controle de qualidade, a própria eficácia da vacina poderá ser ampliada, além de reduzir seus efeitos colaterais: "com o genoma completo da cepa vacinal, será possível melhorar a vacina por meio de técnicas da engenharia genética, 'ligando' ou 'deletando' genes de acordo com sua função", completa o também coordenador do projeto Luiz Roberto Castello Branco, diretor científico da Fundação Ataulpho de Paiva e pesquisador do Departamento de Imunologia do IOC.

Ainda a partir dos resultados dessa pesquisa, fica aberto o caminho para a elaboração de vacinas recombinantes, ou seja, que contenham, inseridas no BCG,

genes que codificam antígenos relacionados a outras enfermidades. A inserção desses genes aumentaria o poder de proteção da vacina, que poderá conferir imunidade a diferentes doenças. "Podemos aproveitar as vantagens da nossa vacina de BCG, que é barata e a única no mundo aplicada por via oral, para imunizar crianças contra outras doenças, como tétano, leishmanioses e varicela", sugere Castello Branco.

Hoje, a vacina de BCG já é utilizada para o tratamento do câncer superficial de bexiga porque, quando aplicada diretamente sobre o órgão doente, o imunizante gera resposta imunológica capaz de controlar a neoplasia. A descrição de seu genoma possibilitará o avanço dessa e outras pesquisas relacionadas à ação do BCG contra doenças como asma, meningites e hanseníase.

Doença atinge principalmente pobres

Embora não tenha, nos meios de comunicação, destaque semelhante

ao oferecido a doenças como dengue e Aids, a tuberculose é um problema grave no Brasil: atinge cerca de 100 mil pessoas por ano, sobretudo entre as classes menos favorecidas, já que sua proliferação está intimamente relacionada às condições precárias de vida, como a aglomeração de muitos indivíduos vivendo em um mesmo cômodo.

Causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (também conhecida como bacilo de Koch), a doença é transmitida pelas vias respiratórias, por meio de gotículas de escarro eliminadas pelo enfermo quando este tosse ou espirra. Seus principais sintomas são tosse prolongada por mais de três semanas, mesmo sem febre, catarro, febre acompanhada de muito suor, perda de apetite e emagrecimento.

O tratamento indicado, à base de antibióticos específicos, é 100% eficaz se seguido corretamente por cerca de seis meses.





Diagnóstico de tuberculose infantil ganha aliado

Bruna Cruz



O diagnóstico da tuberculose infantil, problema de saúde pública que atinge 1,3 milhão de crianças por ano no Brasil, ganhou um aliado de peso. Pesquisadores do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Recife (PE), validaram testes diagnósticos moleculares para a identificação do IS6110, um elemento genético da *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da doença. Os testes apresentaram resultados promissores no diagnóstico de alta complexidade da tuberculose, como é o caso da tuberculose infantil e da tuberculose extrapulmonar, por meio da análise de amostras de sangue.

O método apresenta especificidade de 100% (capacidade descartar o contágio pela tuberculose) e 92,6% de sensibilidade (capacidade de confirmar a doença) em menores de 15 anos de idade. Além de serem sensíveis e específicos, os novos testes são mais rápidos e levam, em média, 24 horas para dar o resultado, enquanto para se obter o resultado da cultura se leva de seis a oito semanas. Os resultados obtidos com os testes já foram apresentados em vários congressos científicos e a equipe responsável tem a perspectiva de publicá-los em breve em revistas científicas de alto impacto.

“As variáveis das técnicas estudadas foram capazes de detectar uma quantidade de DNA menor à existente em uma célula bacteriana, ou seja, a presença de apenas um bacilo pode ser suficiente para indicar que o paciente tem a doença”, comentou Haiana Schindler, coordenadora do estudo e

pesquisadora do Departamento de Imunologia do CPqAM. De acordo com a literatura médica, esses métodos moleculares chegam a apresentar sensibilidade superior a 90% para a detecção da infecção em adultos, mas, até então, não tinham sido testados em crianças. Em média, os métodos convencionais – baciloscopia e cultura – detectam a presença da bactéria em aspirado gástrico (melhor material para identificação da doença entre crianças, sobretudo nos menores de 6 anos que não têm capacidade de expectoração do escarro) em apenas 5% e 40% dos casos, respectivamente.

A pesquisa validou testes moleculares baseados no método de Nested-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), técnica que amplifica um trecho específico do DNA da bactéria em milhares de vezes, em crianças com suspeita de tuberculose. O objetivo foi aperfeiçoar a metodologia para a detecção precoce dos casos de tuberculose infantil e de formas paucibacilares da doença, ou seja, nos casos em que a presença do bacilo no organismo é muito baixa, como ocorre com a tuberculose extrapulmonar. Esse tipo da doença pode ocorrer nos gânglios linfáticos, no sistema urogenital, nos ossos, nas articulações, no fígado, no baço,

no sistema nervoso central e na pele.

O estudo foi realizado com amostras sanguíneas de 117 crianças de ambos os sexos com idades entre seis meses e 14 anos e nove meses (média de 6,5 anos), atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), no Hospital Barão de Lucena e no Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (Imip).

Os pacientes foram divididos entre os que apresentavam manifestações clínicas (tuberculose doença), 41 crianças, e os sem manifestações clínicas (tuberculose infecção), 21 crianças. Outras 15 crianças, negativas para tuberculose, funcionaram como grupo controle. Do total de pacientes com suspeita da doença, 62 tinham suspeita de tuberculose confirmada pelo médico, 32 tinham tido a doença descartada pelo especialista e oito não retornaram aos serviços.

Peter Illiciev / Fiocruz



Teste para tuberculose apresenta especificidade de 100%