

Artigo de Revisão

É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?*

Could a DNA vaccine be useful in the control of tuberculosis?

JOSÉ MACIEL RODRIGUES JÚNIOR, KARLA DE MELO LIMA,
ARLETE APARECIDA MARTINS COELHO CASTELO, VÂNIA LUIZA DEPERON BONATO MARTINS,
SANDRA APARECIDA DOS SANTOS, LUCIA HELENA FACCIOLI, CÉLIO LOPES SILVA.

Vacinas de DNA, ainda em fase de experimentação e testes clínicos, podem se tornar uma importante ferramenta de combate a doenças infecciosas para as quais, até hoje, não existe prevenção segura e eficaz, como a tuberculose. Nos últimos anos vários estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de vacinas de DNA que codificam proteínas de micobactérias, entre as quais destacam-se as que codificam o antígeno 85 (Ag 85) e a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Estes dois antígenos foram os mais estudados apresentando resultados bastante satisfatórios em ensaios pré-clínicos e com grande volume de dados registrados na literatura. Além de proteger contra infecção experimental por *Mycobacterium tuberculosis* virulenta, a vacina DNA-hsp65 também apresenta atividade terapêutica, ou seja, é capaz de curar os animais previamente infectados, inclusive aqueles com bacilos resistentes a múltiplas drogas. Esta vacina, hoje em avaliação clínica no Brasil também para o tratamento de câncer, é capaz de induzir a produção de citocinas de padrão Th1 tal como IFN- interferon-gama, associadas ao controle da doença. Além disso, a vacina de DNA-hsp65 é capaz de estimular clones de células CD8 citotóxicas e CD4 que podem ser caracterizados como células de memória sendo responsáveis por conferir imunidade duradoura contra a infecção. Quando utilizada na terapia da infecção, a vacina de DNA-hsp65 faz com que haja uma mudança no padrão de resposta imune, induzindo a secreção de citocinas de padrão Th1 criando um ambiente favorável à erradicação do bacilo. Os resultados demonstram ainda que a via de administração e a formulação na qual a vacina é administrada exerce fundamental influência no padrão e duração da resposta imune desencadeada. O conjunto de resultados hoje disponíveis mostra que uma vacina de DNA contra a tuberculose contribuirá de maneira significativa no controle desta doença.

J Bras Pneumol 2004; 30(4) 468-77

The DNA vaccines currently under pre-clinical and clinical development may prove to be important tools in combating infectious diseases, such as tuberculosis, for which no safe and effective form of prevention has yet been developed. In recent years, several studies have aimed to develop a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins such as antigen 85 (Ag85) and the 65-kDa mycobacterial heat shock protein (hsp65). The latter is protective against virulent infection with *Mycobacterium tuberculosis* (including multidrug-resistant strains). The hsp65 DNA vaccine, currently under clinical evaluation in Brazil for cancer therapy, is able to induce the secretion of Th1 cytokines, such as gamma-interferon, associated with disease control. Furthermore, this vaccine stimulates cytotoxic CD8 and CD4 T-cell clones that can be characterized as memory cells, which are responsible for effective and long-lasting immunity against tuberculosis. When used as a therapeutic agent in inoculated mice, the hsp65 DNA vaccine promotes changes in the immunity profile, triggering the secretion of Th1 cytokines and establishing a favorable environment for the elimination of bacilli. The results also demonstrate that the route of administration, as well as the formulation in which the vaccine is administered, fundamentally influence the pattern and duration of the immune response induced. Taking all currently available data into account, we can conclude that a DNA vaccine against tuberculosis could contribute significantly to the control of the disease.

Descritores: tuberculose/epidemiologia. Vacina de DNA/uso terapêutico. Proteínas do choque térmico. Auto-imunidade.

Key words: Tuberculosis/epidemiology. Vaccines, DNA/therapeutic use. Heat shock proteins. Auto-immunity.

* Trabalho realizado pela Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Célio Lopes Vieira, Rua Clóvis Vieira, 24 - Campus da USP de Ribeirão Preto. CEP 14049-900 - Ribeirão Preto-SP, Brasil. Email: celsilva@cpt.fmrp.usp.br

Recebido para publicação, em 29/4/04. Aprovado, após revisão, em 27/5/04.

O que é vacina de DNA

Nas últimas décadas, os avanços na tecnologia de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Essas estratégias abriram caminhos para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as vacinas, consideradas de segunda geração, de sub-unidades constituídas de antígenos purificados ou recombinantes provenientes da cultura dos agentes infecciosos, ou obtidos por meios sintéticos. Mais recentemente, surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde os genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são carregados por DNA plasmidial.

A vacina de DNA, ainda em fase de experimentação e testes clínicos, pode se tornar a maior ferramenta de combate a doenças infecciosas para as quais, até hoje, não existe prevenção segura e eficaz, como herpes, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), malária, tuberculose, hepatite, esquistossomose e dengue, dentre outras. Além disso, elas têm grande potencial de aplicação na prevenção e cura de determinados tipos de câncer.

O isolamento de genes é um processo de domínio da comunidade científica devido ao grande desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Para a construção da vacina de DNA, os genes, freqüentemente relacionados com a expressão de moléculas associadas com a virulência ou patogenia dos agentes infecciosos, são clonados e inseridos em um fragmento de DNA circular denominado plasmídeo. Os plasmídeos usados em vacinas gênicas devem ter: origem de replicação em bactérias, o que permite a sua eficiente duplicação, chegando a centenas de cópias por célula; um gene de seleção, que geralmente confere resistência a um antibiótico, permitindo assim a seleção dos clones de células que carregam o plasmídeo; um sítio múltiplo de clonagem que pode ser clivado com enzimas de restrição, permitindo a inserção do gene de interesse, que no caso das vacinas é um gene que codifica um antígeno; um promotor, geralmente um promotor viral, que permite a transcrição do

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho:

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
 Ag 85 - Antígeno 85
 TB - Tuberculose
 BCG - Bacilo Calmette-Guérin
 RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction
 AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
 OMS - Organização Mundial da Saúde
 Hsp65 - Proteína de choque térmico de 65 KDa
 PLGA - Ácido poli-lático e glicólico
 DMT - Dimicolato de trealose
 MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
 IL - Interleucina
 IFN - Interferon

gene de interesse em células eucariotas. Após a clonagem do gene que codifica o antígeno vacinal no plasmídeo, ele é introduzido em uma bactéria hospedeira, geralmente *Escherichia coli*, por um processo denominado de transformação bacteriana, com a finalidade de se produzir plasmídeos em larga escala e haver quantidade suficiente de DNA para a vacinação propriamente dita⁽¹⁾.

A administração da vacina de DNA pode ser feita em várias espécies animais e no homem por diversas vias e esquemas. Além da injeção intramuscular, que é a via mais utilizada, as vacinas gênicas também podem ser administradas por via intranasal, na forma de aerossol, por via oral ou por via intradérmica por meio de bombardeamento de micropartículas de ouro cobertas com o material genético. Embora a injeção intramuscular seja um processo simples e de baixo custo, sua utilização na maioria das vezes requer uma quantidade elevada de plasmídeo para estimular uma resposta imune adequada. Solução de glicose hipertônica para edemaciar o tecido muscular⁽²⁾, ou de anestésicos locais, como a bupivacaína, que são capazes de lesar o tecido e causar uma reação inflamatória⁽³⁻⁵⁾, têm sido empregados como alternativas para aumentar a transfecção de antígenos, para os macrófagos e células dendríticas, após a injeção intramuscular. Entretanto, tais procedimentos não são aceitáveis para utilização em clínica humana devido aos seus efeitos colaterais. A injeção intramuscular do plasmídeo é uma técnica simples, mas expõe o DNA a uma série de inconvenientes no local de administração como a presença de enzimas (nucleases) capazes de degradar o DNA plasmidial, tornando-o ineficaz para induzir a resposta imune.

Outro fato relevante refere-se ao tamanho da

molécula de DNA e à sua carga negativa superficial, que limitam sua penetração na célula-alvo, sendo necessárias doses maiores de DNA para indução de uma resposta imune significativa. Um pré-requisito para a eficácia do uso de DNA como vacina ou terapia gênica está relacionado à liberação efetiva do ácido nucléico na célula-alvo. O ácido nucléico deve atingir o núcleo da célula e isto tem sido viabilizado pelo uso de vetores vivos (bacterianos e virais) e não vivos (sistemas sintéticos). Existe uma estimativa de que apenas uma em cada 1.000 moléculas de plasmídeo administradas é capaz de atingir o núcleo e expressar a mensagem para a síntese da proteína desejada, fazendo com que um tratamento usual exija a administração de doses elevadas de DNA plasmidial, da ordem de algumas centenas de microgramas a miligramas. O DNA recombinante com grau farmacêutico pode ser obtido por meio de expressão em bactérias transformadas e purificado por uma série de métodos cromatográficos, permitindo sua obtenção em grande escala^[6].

Perspectivas de uma vacina de DNA contra tuberculose

Atenção especial vem sendo dada para o desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a tuberculose. A tuberculose (TB) persiste como a doença infecciosa que mais causa mortes em todo o mundo e, recentemente, atingiu a marca de 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano, 18,5% de todas as mortes em adultos entre 15 e 59 anos, o que corresponde à fase mais produtiva da população mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 32% da população mundial estão infectados. Na última década, 300 milhões de pessoas foram infectadas, 90 milhões de novos casos da doença foram notificados e cerca de 30 milhões morreram. Em 1993 a tuberculose foi declarada emergência global pela OMS e o *M. tuberculosis* é agora considerado o agente infeccioso responsável por mais mortes em adultos do que qualquer outro.

Várias vacinas candidatas ao combate à tuberculose vêm sendo estudadas. Dentre elas destacam-se as que codificam o antígeno 85 (Ag 85) e a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Esses dois antígenos foram os mais estudados, e apresentaram resultados bastante

satisfatórios em ensaios pré-clínicos, com grande volume de dados registrados na literatura. Neste artigo serão abordados os resultados obtidos com a hsp65.

Para o desenvolvimento de uma vacina de DNA contra a tuberculose, Silva *et al.* introduziram nos plasmídeos pCDNA3 ou pHMG o gene de um dos antígenos imunodominantes de micobactérias, a proteína de estresse hsp65 de *M. leprae*. Efetivamente, ambos os plasmídeos dirigem a expressão do gene hsp65 micobacteriano em células de mamíferos^[7-9]. Os plasmídeos contendo o gene micobacteriano foram inoculados por via intramuscular em camundongos. Todos os testes de vacinação foram comparados com um grupo de animais inoculados somente com BCG intradérmico ou com plasmídeos sem o gene hsp65. A produção de anticorpos específicos no soro dos animais imunizados com o DNA hsp65 foi observada duas semanas após a terceira dose do plasmídeo. A indução da resposta imune celular foi detectada por um teste específico, que é a medida da capacidade proliferativa dos linfócitos presentes nos nódulos linfáticos, quando colocados na presença do antígeno hsp65. Mediadores e reguladores da resposta imune, como as interleucinas, também foram detectados no sobrenadante de cultura, ou nos próprios linfócitos dos animais imunizados, tanto por técnicas de ELISA quanto por RT-PCR. Nestes, estava aumentada a liberação de interferon-gama (IFN- γ), e de interleucina (IL-2 e IL-12), consideradas citocinas estimulatórias da resposta imune celular do tipo Th1, mas não de IL-4, IL-10 e IL-13, que são supressoras dessa resposta. Portanto, o padrão de resposta imunológica induzida nos camundongos, pela imunização com o DNA hsp65, foi demonstrado ser do tipo Th1, o qual é altamente favorável para a eliminação de agentes infecciosos.

Proteção induzida pela vacina de DNA

A imunização de camundongos com DNA hsp65 foi altamente efetiva para proteger os animais contra posterior infecção com *M. tuberculosis*, sendo o efeito protetor muito semelhante àquele apresentado pelos animais vacinados com BCG^[10]. Com base nestes dados, foram clonados outros antígenos micobacterianos (hsp70, hsp10, 36 kDa e ESAT6) nos plasmídeos

pCDNA3 e pHMG e posteriormente testadas as suas atividades protetoras. Os DNAs que codificam os antígenos hsp70 e ESAT6 induziram proteção significativa, porém menor que aquela mostrada pela hsp65. Por outro lado, as imunizações com DNA que expressa hsp10 e 36 KDa não mostraram atividade protetora contra infecção por *M. tuberculosis*. Em resumo, esses estudos demonstraram que as inoculações das vacinas de DNA que codificam os genes das proteínas imunogênicas hsp65, hsp70 e 36 KDa por via intramuscular, associados aos promotores do CMV e da hidroximetilglutaril-CoA redutase, conferem proteção significativa contra infecção por *M. tuberculosis* em camundongos⁽¹¹⁾.

Células envolvidas com a proteção e estudos sobre memória imunológica

Vários estudos foram conduzidos por Silva *et al.* no sentido de melhor caracterizar as subpopulações celulares associadas ao controle do processo infeccioso, bem como aos mediadores envolvidos (interleucinas) e às funções efetoras desencadeadas no decorrer do processo de ativação celular. A compreensão destes fatores contribui para o entendimento dos mecanismos imunes envolvidos na patogenia da tuberculose, permitindo novas perspectivas para o controle da enfermidade. Estudos comparando animais infectados com *M. tuberculosis* e vacinados com DNA-hsp65 foram realizados para estabelecer relações entre o fenótipo das subpopulações de células T, os mediadores liberados por estas células, e a expressão de moléculas relacionadas com migração celular e memória imunológica (CD44).

Células T de animais previamente vacinados foram transferidas para animais não imunizados e desafiados concomitantemente com *M. tuberculosis* H37Rv. Estes animais controlaram melhor a infecção quando comparados com animais que foram somente infectados com os bacilos. O fenótipo celular associado à proteção foi caracterizado por células que apresentaram elevada expressão de CD44 em sua superfície (CD44^{hi}). Estas células CD44^{hi} de animais imunizados foram capazes de controlar melhor a proliferação dos bacilos quando comparadas às células CD44^{lo} destes mesmos animais imunizados e às células CD44^{hi} ou CD44^{lo} de animais infectados. Verificou-se também que entre as células CD44^{hi},

as células CD8⁺/CD44^{hi} foram mais eficientes que as células CD4⁺/CD44^{hi} no controle da infecção, impedindo a multiplicação dos bacilos. Ainda com relação ao fenótipo celular que confere proteção na infecção pelo *M. tuberculosis*, foi demonstrado que as células CD44^{hi} produziam predominantemente IFN- γ , enquanto as células CD44^{lo} produziam preferencialmente IL-4^(7,12).

Com a finalidade de melhor definir o fenótipo das células que conferiam proteção na infecção micobacteriana, foram selecionados clones T CD4⁺/CD44^{hi}, T CD4⁺/CD44^{lo}, T CD8⁺/CD44^{hi} e T CD8⁺/CD44^{lo}, provenientes de animais vacinados e infectados. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas por seleção negativa e separadas por FACSort em subpopulações CD44^{hi} e CD44^{lo}. Por meio da técnica de diluição limite, foram selecionados 16 clones T CD4⁺ e 16 clones T CD8⁺ de animais imunizados e de animais vacinados com o DNA hsp65. Estes clones foram caracterizados quanto à expressão de CD44 (CD44^{hi} ou CD44^{lo}), produção de IFN- γ ou IL-4 e capacidade citotóxica. Os resultados mostraram que os quatro clones CD8⁺/CD44^{hi}, obtidos de animais imunizados, produziam IFN- γ e eram citotóxicos. Estes clones conferiam maior proteção aos animais infectados quando comparados aos clones T CD8⁺/CD44^{lo}. Todos os quatro clones T CD4⁺/CD44^{hi} também secretavam IFN- γ e três eram citotóxicos. No entanto, a capacidade de proteção destes clones foi inferior à dos clones T CD8⁺/CD44^{hi}. Quanto aos clones obtidos de animais infectados, verificou-se que dos quatro clones T CD8⁺/CD44^{hi}, somente dois produziam IFN- γ e eram citotóxicos, enquanto os outros dois produziram IL-4 e não apresentaram capacidade citotóxica^(7,12,13).

Nesse contexto, a vacinação com DNAhsp65 resultaria na formação de um conjunto de clones de células CD4 e CD8 que expressariam altos níveis de CD44. Os clones CD44^{hi} poderiam estar relacionados com funções de memória imunológica e, possivelmente, com uma migração mais rápida para o local de infecção, onde poderiam encontrar a célula apresentadora de antígeno adequada. Assim, estes resultados indicam que a imunização prévia, através de veículos e vias adequadas, seria importante para desencadear resposta imune específica, tanto local como sistêmica, eficiente no controle da infecção micobacteriana.

Uso de carreadores na vacina gênica contra tuberculose

Em relação à vacina de DNA baseada na proteína hsp65, até então utilizada como DNA nu e administrada por via intramuscular, múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo são necessárias, no mínimo 3 doses de 100 µg, para promover a proteção ou cura efetiva em modelo experimental de tuberculose em camundongos¹⁴. Entretanto, no que diz respeito às vacinas em desenvolvimento, existe uma necessidade de simplificar os esquemas de imunização, reduzindo-se o número de doses necessárias para estimular imunidade protetora. Para isso, diferentes estratégias têm sido empregadas envolvendo a utilização de diferentes tipos de adjuvantes⁽¹⁵⁾.

A fim de otimizar a vacina visando a redução da quantidade de DNA injetada, avaliou-se a sua administração pela via intradérmica com o uso de *gene gun*. Entretanto, dados de estudos comparativos mostram que a injeção intramuscular de DNA induz preferencialmente um padrão Th1 de resposta imune, enquanto que o bombardeamento com *gene gun* apresenta uma tendência para o desencadeamento de padrão Th2 de resposta. De fato, a administração de DNA-hsp65 por *gene gun* estimulou ambos os tipos de resposta humoral e celular com uma dose 100 vezes menor do que a utilizada nos protocolos convencionais de injeção intramuscular. Os níveis de imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2a apresentaram diferenças, sendo que o *gene gun* estimulou preferencialmente anticorpos da subclasse IgG1, o que sugere uma ativação de resposta de padrão Th2. Além disso, os camundongos BALB/c imunizados com DNA-hsp65 por injeção intramuscular produziram altos níveis de IFN- γ , enquanto que a imunização por *gene gun* não induz a produção de IFN- γ , mas sim de citocinas de padrão Th2 como IL-10 e IL-4, podendo tal resposta ser associada à pequena quantidade de DNA utilizada nesta técnica. A redução na quantidade de DNA vem acompanhada da redução da quantidade de motivos CpGs. De fato, os camundongos imunizados com DNA-hsp65 por injeção intramuscular apresentaram redução da carga bacilar nos pulmões. Já os animais imunizados por *gene gun* não foram capazes de reduzir a carga bacilar, o que indica que esta técnica, embora permita o desencadeamento de

resposta imune específica com doses significativamente menores de DNA, não é adequada para a administração da vacina de DNA-hsp65 visando ao combate à tuberculose⁽¹⁶⁾.

Uma segunda estratégia para otimizar a vacina de DNA-hsp65 consistiu no seu encapsulamento em microesferas poliméricas biodegradáveis. Os resultados demonstraram que o DNA pode ser encapsulado nas microesferas de ácido poli-lático e glicólico (PLGA) sem o comprometimento da sua funcionalidade. O método utilizado permitiu a obtenção de partículas com um tamanho adequado para promover a vetorização para células fagocitárias, além de apresentar uma boa eficiência de encapsulação do DNA. Os estudos *in vitro* demonstraram que células fagocitárias capturam as microesferas de PLGA, que por sua vez liberam o DNA encapsulado, o qual dirige a síntese da proteína antigênica. Então, a utilização de microesferas de PLGA pode ser uma importante ferramenta para o direcionamento do DNA para células apresentadoras de antígenos profissionais, após injeção intramuscular ou subcutânea. A capacidade de transfectar as células apresentadoras de antígeno profissionais diretamente pode ser interessante visto que vários trabalhos demonstram que peptídeos antigênicos, envolvidos na estimulação de linfócitos T citotóxicos após vacinação com DNA, são apresentados no contexto de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I de células derivadas de medula óssea e não pelos miócitos transfectados⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Então, quando diretamente transfectadas *in vivo*, estas células que expressam moléculas co-estimulatórias na sua superfície apresentam antígenos fornecendo os sinais necessários para a estimulação de linfócitos T. Após a injeção intramuscular, as microesferas ainda formam um depósito tecidual recrutando células apresentadoras de antígeno para o sítio de administração, o que facilita a captura das partículas pelas mesmas e, conseqüentemente, a sua transfecção. As microesferas são capazes de melhorar a apresentação do antígeno, mas não apresentam nenhuma propriedade imunoestimulante. Portanto, a formulação de microesferas contendo DNA foi capaz de estimular resposta imune específica, mas esta não foi suficiente para proteger camundongos BALB/c contra infecção desafio por *M. tuberculosis*.

A fim de melhorar a capacidade imunogênica da

formulação de microesferas, utilizou-se como estratégia a combinação de adjuvantes com propriedades imunoestimulantes e carreadoras empregando a tecnologia de microencapsulação. Foi elaborada uma nova formulação contendo a vacina de DNA-hsp65 e um composto imunoestimulante, o dimicolato de trealose (DMT), ambos encapsulados em microesferas biodegradáveis⁽²⁰⁾.

A capacidade das microesferas de PLGA de liberar o plasmídeo encapsulado lentamente sugere sua potencialidade em sustentar a expressão da proteína por um período mais prolongado sem a necessidade de doses de reforço, em comparação com a injeção intramuscular do DNA nu. Dados de RT-PCR mostraram a expressão do RNA mensageiro para hsp65 no baço e linfonodos dos animais imunizados com uma única dose de DNA em microesferas, 15 dias após a imunização. Entretanto, não se verificou a mensagem para hsp65 nestes órgãos linfóides secundários onde ocorre a estimulação dos linfócitos em animais imunizados com três doses de DNA nu.

No que concerne à resposta imune, observou-se uma mudança significativa na qualidade dos anticorpos após imunização com microesferas contendo DNA-hsp65/DMT. Nestes animais, a resposta humoral foi caracterizada por altos níveis de IgG2a, enquanto que animais imunizados com DNA nu apresentaram um padrão misto com altos níveis de IgG1 e IgG2a. A resposta imune celular foi caracterizada pela produção de altos níveis de IFN- γ . Trinta dias após o desafio, os animais imunizados com microesferas contendo DNA-hsp65 e DMT apresentavam altos níveis de IFN- γ no pulmão⁽²¹⁾. Este perfil pode ter sido favorecido pelo DMT. Ryll *et al.* (2001) mostraram que o DMT pode estimular uma resposta imune evidenciada pela proliferação de células NK e que ele também pode iniciar uma resposta imune precoce com liberação de IFN- γ levando à ativação de macrófagos com regulação positiva da expressão de moléculas de MHC classe II e CD1⁽²²⁾. Portanto, o DMT pode fornecer as condições ótimas para iniciar a resposta imune, o que o torna um bom componente estimulador de resposta Th1 em uma formulação candidata a vacina contra tuberculose.

Uma proteção significativa contra infecção com *M. tuberculosis* H37Rv foi alcançada quando camundongos foram vacinados com DNA-hsp65 nu por injeção intramuscular ou com DNA-hsp65

e DMT encapsulados em microesferas. Porém, cabe ressaltar que a formulação composta por microesferas contendo DMT e DNA-hsp65 foi capaz de estimular a resposta imune protetora após uma única administração, enquanto que a injeção intramuscular do DNA nu requer três doses para conferir a mesma proteção. Esta vacina baseada em microesferas permitiu ainda a redução da dose de plasmídeo em dez vezes quando comparada àquela com DNA nu. Estes dados demonstram que a resposta imune para um determinado antígeno, utilizando-se uma cepa particular de camundongo, é diretamente influenciada pelo método de administração do DNA. O desenvolvimento de formulações envolvendo a combinação de adjuvantes com diferentes mecanismos de ação pode representar uma alternativa para a obtenção de vacinas mais efetivas.

Explorando a estratégia *prime-boost*

A duração da proteção conferida por uma vacina tem sido associada com a permanência do antígeno no organismo. Desta forma, em alguns esquemas de vacinação se faz necessária a administração de doses de reforço para sustentar a imunidade estimulada pela dose inicial. Recentemente, o princípio de “dose inicial-reforço” (*prime-boost*) tem sido bastante explorado dentro de um conceito de reforço heterólogo. Neste caso, o mesmo antígeno é apresentado de forma diferente para o sistema imune durante a dose inicial e a de reforço. Nesse tipo de estratégia é fundamental que a formulação utilizada na dose inicial induza a resposta com o padrão requerido para conferir proteção ao indivíduo vacinado. Já a dose de reforço tem como função apenas a expansão e manutenção da resposta inicialmente estimulada. Os protocolos mais comuns envolvem a utilização de vacinas de DNA ou sub-unidade durante a dose inicial, e carreadores vivos, tais como vírus ou bactérias recombinantes expressando o antígeno em questão, nas doses de reforço. Apesar de haver alguns resultados bem sucedidos, este tipo de protocolo traz de volta os vetores vivos, cujo uso se tentou evitar com o desenvolvimento das vacinas de DNA e sub-unidades. A estratégia de vacinação *prime-boost* envolve o uso de duas vacinas diferentes, cada uma codificando o mesmo antígeno, administrado em intervalos de algumas semanas. Tal estratégia

tem sido capaz de aumentar a resposta imune celular em diferentes modelos animais de infecções²³. Como dito anteriormente, a maioria dos protocolos para imunização por *prime-boost* em desenvolvimento inclui a indução da resposta imune com um vetor gênico, como um DNA plasmidial, utilizando vetores vivos virais²⁴. Na prevenção da tuberculose, a estratégia *prime-boost* tem sido avaliada combinando-se a dose de indução da resposta imune com DNA com a manutenção da resposta imune com BCG atenuado ou proteínas recombinantes^{25,26}. Esses protocolos normalmente requerem mais de uma dose de DNA para a indução da resposta imune, que serão seguidas das doses de reforço.

Com o intuito de tornar vacinas gênicas produtos viáveis, o vetor gênico deve atingir as células alvo na sua forma ativa, o que significa que este tem que vencer as diferentes barreiras do organismo. O encapsulamento do plasmídeo em microesferas poliméricas biodegradáveis é uma das estratégias que têm sido propostas com sucesso para resolver esse desafio^{27,28}. Entretanto, utilizando-se um modelo experimental murino, observou-se que a resposta imune induzida por microesferas contendo DNA-hsp65 diminui 90 dias após a vacinação. A fim de aumentar a duração da resposta imune desencadeada pelo DNA encapsulado em microesfera, avaliou-se o efeito do reforço com proteína recombinante também encapsulada em microesferas e administrada conjuntamente com o DNA. Entretanto, numa formulação de microesferas contendo DNA e proteína, a liberação do DNA antes da liberação da proteína é fundamental para assegurar o sucesso na prevenção da tuberculose devido à sua capacidade de estimular resposta Th1, o que não se dá com as microesferas contendo hsp65 recombinante. Além disso, o co-encapsulamento do DMT como imunoestimulante favorece o desenvolvimento do padrão Th1 de resposta, uma vez que é capaz de induzir a secreção de citocinas, como IL-12, contribuindo para criar um microambiente favorável à diferenciação de linfócitos Th1 durante a apresentação do antígeno⁽²⁰⁾.

A hsp65 recombinante foi inicialmente encapsulada em microesferas de PLGA 75:25, que sustentam sua liberação por um período de 90 dias. Esta capacidade pode ser atribuída ao

maior número de monômeros de ácido láctico na cadeia polimérica, o que a torna menos hidrofílica, reduzindo sua degradação hidrolítica se comparada às microesferas de PLGA 50:50 que encapsulam o DNA. A combinação de microesferas de PLGA 50:50 contendo DNA-hsp65 e DMT com microesferas de PLGA 75:25 contendo hsp65 recombinante (*prime-boost*) foi capaz de induzir a produção de altos níveis de anticorpos anti-hsp65. Os níveis séricos desses anticorpos são mantidos elevados por 90 dias após a vacinação. Observou-se também alta produção de IFN- γ pelas células esplênicas dos animais vacinados durante todo o período avaliado (90 dias). Esses resultados sugerem o promissor potencial deste sistema de *prime-boost* baseado em vetores não vivos para aumentar a duração da resposta imune e transpor riscos relacionados à toxicidade.

Terapia gênica na tuberculose: Atividade terapêutica da vacina DNA hsp65

Até recentemente, não havia perspectivas de se eliminar o bacilo da tuberculose do grande número de indivíduos infectados – um terço da população mundial. O bacilo aloja-se com maior frequência no pulmão, por tempo indefinido, mas pode infectar outros órgãos permanecendo contido pelas células de defesa do organismo. Em decorrência da diminuição da resistência orgânica (desnutrição, subnutrição, estresse ou associação de outras doenças), o bacilo tende a se reproduzir intensamente e pode levar o indivíduo à morte, caso não seja devidamente tratado. A partir dessa fase de reprodução, considera-se instalada a doença, podendo ocorrer a contaminação de outras pessoas. A doença pode provocar graves lesões que perduram mesmo após o extermínio do bacilo, causando grande sofrimento ao paciente.

Desenha-se um quadro de aumento da letalidade da tuberculose, que precisa ser equacionado com rapidez nos próximos anos. Assim, a evolução de um modelo adequado de combate ou controle da tuberculose é uma necessidade iminente.

Os experimentos têm mostrado que a administração da vacina DNAhsp65, em animais previamente infectados com *M. tuberculosis* virulenta, não só previne o desenvolvimento da doença como também elimina a infecção⁽²⁹⁾. Este

fato torna-se realmente relevante quando se considera que cerca de dois bilhões de pessoas já estão infectadas pelo bacilo da TB. No Brasil são cerca de 60 milhões de pessoas. Além disso, a vacina tem a propriedade de cura mesmo quando administrada em estados mais avançados da doença ou após sua disseminação por todo o organismo do animal. A infecção por *M. tuberculosis* faz com que o sistema imunológico dos animais passem a não responder contra o agente agressor e permite o crescimento acelerado dos bacilos e o estabelecimento da doença. Nessas condições a terapia gênica com a vacina de DNA hsp65 permitiu uma mudança radical e profunda da resposta imunológica, passando do padrão Th2 para o Th1, criando condições para o organismo combater os bacilos e curar a doença, mesmo sem a administração de quimioterápicos antimicobacterianos⁽²⁹⁾. Esta foi a primeira demonstração de que uma vacina gênica seja capaz de curar uma doença infecciosa.

Imunoterapia da tuberculose multi-droga resistente

Um dos problemas mais sérios relacionados com o controle da TB é o aparecimento de bacilos que apresentam resistência a vários medicamentos utilizados no tratamento como a isoniazida, a pirazinamida, a estreptomina e a rifampicina, dentre outros. Já foram isolados bacilos que são resistentes não só a um desses medicamentos como também a combinações de dois, três e mesmo a todos ao mesmo tempo. Esses pacientes, portadores de bacilos denominados multidroga-resistentes, contam com poucas alternativas de tratamento e, às vezes, com nenhuma opção. Trabalhos recentes mostraram que animais infectados com bacilos resistentes a essas drogas também são curados pela administração da vacina gênica⁽²⁹⁾.

Imunoterapia da tuberculose latente

Outro problema associado ao alto índice de indivíduos infectados correlaciona-se com o alto grau de adaptação dos bacilos ao homem. A infecção normalmente se estabelece após a inalação dos bacilos e entrada dos mesmos nas células de defesa do organismo. Dentro dos macrófagos, que são células com alto potencial

microbicida, os bacilos têm a habilidade de desativar seus sistemas de defesa e conseguem sobreviver e se multiplicar no seu interior. O sistema de defesa imune do homem identifica a presença dos bacilos e estabelece uma resposta contra os mesmos, caracterizada por uma reação inflamatória crônica e granulomatosa que tem a finalidade de circunscrever e delimitar a infecção. Nestas condições os bacilos podem sobreviver por anos em estado de latência ou dormência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença. A doença manifesta-se quando há um desequilíbrio dessa relação mútua e está freqüentemente associada com estados de supressão da resposta imunológica. Entre os casos mais comuns de imunossupressão associados com a tuberculose estão os indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), estressados, que utilizam fármacos imunossupressores, dependentes químicos (como os dependentes de álcool) e desnutridos, dentre outros.

O estado de latência ou dormência das micobactérias, que podem sofrer uma reativação e manifestar a doença em estados de imunossupressão, também foi analisado com o uso da terapia gênica. Foi desenvolvido um modelo experimental em camundongos que mimetiza as condições observadas no desenvolvimento da doença humana em indivíduos imunossuprimidos. Nos grupos de animais controle, que não foram vacinados (infectados, tratados com fármacos antibacterianos para estabelecer um estado de latência e tratados com corticosteróide para causar imunossupressão), observou-se reativação da infecção e estabelecimento da doença. Nos grupos experimentais que foram tratados com a vacina de DNA, não foram observadas reativações e desenvolvimento da doença, principalmente quando foram administradas três doses da vacina²⁹. A eliminação das bactérias dormentes pela vacina de DNA pode trazer benefícios significativos para o controle da TB e mesmo a sua erradicação.

A vacina gênica foi utilizada no tratamento da doença, em conceito diferente em relação às vacinas convencionais, que são utilizadas somente como prevenção à instalação da doença. Essa vacina de DNA cura a infecção, cura a doença estabelecida e impede que ocorra a reativação da

doença, sem perder a sua característica profilática. Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento dessa vacina com atividade terapêutica contra a tuberculose são inúmeros. Ela é segura, eficaz, pode ser dada em uma única dose, estimula amplamente a resposta imunológica, tem efeito protetor duradouro e pode contribuir significativamente para a diminuição da incidência da doença.

redução do período de tratamento da tuberculose com o uso de drogas e vacina de DNA

Fármacos bactericidas eliminam os bacilos susceptíveis que estão se multiplicando normalmente, mas a alteração da imunidade na tuberculose clínica impede a destruição adequada dos bacilos remanescentes. Estes organismos seriam responsáveis pela reativação da doença, prolongando o período de tratamento. A associação da imunoterapia com vacina de DNA à quimioterapia convencional tem como objetivo o restabelecimento das funções do sistema imune após a remoção da maior parte dos bacilos. Os mecanismos imunes devem reconhecer e destruir os bacilos persistentes, reduzindo desta forma o período de tratamento da quimioterapia a ser administrada para prevenção de uma re-incidência. Vários protocolos e esquemas terapêuticos foram usados com quimioterápicos e imunoterápicos como o DNA-hsp65, concomitantemente, na tentativa de reduzir o período de tratamento contra a tuberculose. Animais foram infectados por via intravenosa, com aerossol e por via intratraqueal com *M. tuberculosis* e após estabelecimento da infecção (presença de bacilos no baço, pulmão e fígado) o tratamento consistiu na associação da vacina de DNA-hsp65 com drogas como rifampicina, estreptomicina, isoniazida e pirazinamida. A vacina BCG foi usada para comparação da resposta. A avaliação foi realizada pela contagem do número de bacilos presentes nos órgãos dos animais, principalmente no pulmão, e estudo da resposta imunológica por dosagens de citocinas. Em um experimento piloto, o uso concomitante da vacina de DNA-hsp65 juntamente com a isoniazida e a pirazinamida foi eficaz e permitiu uma redução significativa do período de tratamento dos animais infectados com *M. tuberculosis*.

Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento de vacinas gênicas são inúmeros e absolutamente desejáveis no contexto dos problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas que podem ser prevenidas por imunização gênica será, provavelmente, uma das aquisições mais importantes advindas do domínio desta nova tecnologia. O desenvolvimento de novas vacinas que evitem, num futuro próximo, o aumento descontrolado de doenças infecciosas é de fundamental importância para a humanidade. Uma vacina de DNA contra a tuberculose contribuirá de maneira significativa para o controle desta doença.

REFERÊNCIAS

1. Silva CL. Vacinas gênicas. *Biotechnology - Ciên. Desenvol.* 1997;3:32-4.
2. Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer in skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Human Gene Ther.* 1993;4:151-6.
3. Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S. Gene transfer in generating muscle. *Human Gene Ther.* 1995;5:11-2.
4. Wang B, Ugen K, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Rafaeliu J, et al. Gene inoculation generates immune responses against HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:4156-60.
5. Wells DJ. Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993;332:179.
6. Ferreira GNM, Monteiro GA, Prazeres DMF, Cabral JMS. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Tibtech.* 2000;18:380-7.
7. Bonato VLD, Lima VMF, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis infected mice. *Infec Immunol.* 1998;66:169-75.
8. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva CL. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine.* 1994;12:1537-40.
9. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by plasmid DNA. *Vaccine.* 1997;15:834-8.
10. Lowrie DB, Tascon RE, Silva CL. Vaccination against tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;108:309-12.
11. Lowrie DB, Colston MJ, Tascon RE, Silva CL. DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. In: Brown F, Burton D
12. Silva CL. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infect Immunol.* 1996;64:2400-7

13. Silva CL; Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology* 1999;97:573-81.
14. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol. Cell Biology* 1997;75:591-4.
15. Morein B. Novel adjuvants and vaccine delivery systems. *Vet. Immunol Immunopatol.* 1996;54:373-84.
16. Lima KM, dos Santos SA, Santos Jr. RR, Brandão IT, Rodríguez Jr. JM, Silva CL. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination varies for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine.* 2003;22:49-56.
17. Doe, B. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:8578-83.
18. Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med.* 189:169-77
19. Klinman DM. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol.* 1999;160:2388-92.
20. Lima VMF. Role of trehalose Dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infec Immun.* 2001;69:5305-12.
21. Lima KM, Santos AS, Lima VMF, Coelho-Castelo AAM, Rodrigues Jr JM, Silva CL. Single-dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterium hsp65 protein plus TDM-loaded microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.* 2003;10:678-85.
22. Ryll R. Mycobacterium cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbiol Infect.* 2001;3:611-9.
23. McShane H. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4:23-7
24. Robinson, H.L. Prime boost vaccines power up in people. *Nat Med.* 2003;9:642-3.
25. Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, et al. A DNA prime-Mycobacterium bovis BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immunol.* 2003;71:4901-7.
26. Vordermeier HM, Lowrie DB, Hewinson RG. Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. *Vet Microbiol.* 2003;93:349-59.
27. Lunsford L, McKeever U, Eckstein V, Hedley ML. Tissue distribution and persistence in mice of plasmid DNA encapsulated in a PLGA-based microsphere delivery vehicle. *J Drug Target.* 2000;8:39-50.
28. Briones M, Singh M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Klakamp S, Ott G, O'Hagan D. The preparation, characterization, and evaluation of cationic microparticles for DNA vaccine delivery. *Pharm Res.* 2001;18:709-12.
29. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 1999;400:269-71.