3. Genômica funcional

Eloi S. Garcia

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

GARCIA, E.S. Genômica funcional. In: *Genes: fatos e fantasias* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006, pp. 65-78. ISBN: 978-65-5708-102-0. <https://doi.org/10.7476/9786557081020.0005>.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

3

Genômica Funcional

A genômica funcional descarta o enfoque reducionista – estudar individualmente os genes e seus produtos – e focaliza holisticamente a compreensão biológica da expressão genética, pela definição compreensiva e estudos simultâneos de todos os genes nos estados fisiológicos e patológicos. A análise global da função do gene melhorou nossa habilidade de descobrir novos genes envolvidos em funções biológicas específicas, mesmo que dados não mensuráveis estejam presentes na investigação. A genômica funcional procura refinar a compreensão complexa das patologias ao definir novos alvos terapêuticos e marcadores moleculares para diagnósticos, e é fundamental porque envolve métodos que facilitam a compreensão da multiplicidade das funções dos genes no complexo sistema biológico.

O Balé das Moléculas

Semanalmente a imprensa divulga descobertas de novos medicamentos para o tratamento de doenças humanas, como câncer, moléstias nervosas ou degenerativas, e até mesmo infecções resistentes a antibióticos. Inúmeros avanços na área médica foram divulgados após os dados do genoma humano estarem disponíveis. Um dia, são descobertos os genes da asma ou do câncer de pele. No outro, vem à tona a ameaça dos alimentos transgênicos ou dos clones humanos. Faz parte dos protocolos científicos em todos os continentes saber onde os genes estão, o que fazem e quais os modos de controlá-los ou alterar sua atividade.

O ser humano já está aprendendo a modificar seus genes e outros aspectos de seu sistema biológico. Ou seja, está modificando a si próprio. Até recentemente, as pesquisas de moléculas potencialmente aptas a servirem como fármacos no futuro ainda eram realizadas nos laboratórios de maneira clássica. Uma vez que a estrutura de um novo princípio ativo era identificada – o que

geralmente ocorria pelo estudo da química das plantas –, os químicos determinavam sua rota de síntese, produziam análogos estruturais, estudavam como a substância atuava em animais de laboratórios e, numa segunda etapa, verificavam sua atividade em nível molecular.

Nesse processo clássico de triagem de substâncias para o desenvolvimento de um medicamento novo, a cada 10 mil compostos analisados 100 mostravam-se promissores, 10 chegavam a ser testados em seres humanos e um 1 era eventualmente colocado no mercado como medicamento.

Tudo mudou! A genômica funcional tem sido um sucesso para a identificação de novos alvos terapêuticos. A possibilidade de identificação de mais dez mil antígenos-alvo, no genoma humano, abre oportunidades inéditas para a descoberta de novos fármacos e moléculas terapêuticas. Adicionalmente a genômica funcional possibilita também demarcar geneticamente os pacientes e estimar suas respostas a determinados medicamentos. Isto permite redução nos custos dos tratamentos, aumenta sua segurança e eficácia e reduz a toxicidade da droga.

O desenvolvimento da química combinatória, o aperfeiçoamento de bancos de dados com dezenas de milhares de estruturas químicas e os testes moleculares realizados em laboratórios totalmente ‘robotizados’ e computadorizados têm acelerado a descoberta de novos fármacos. Nesses laboratórios, milhares de compostos poderão ser analisados em poucos meses, com modelos de detecção em receptores protéicos envolvidos em doenças específicas, sem a utilização de animais. Com esta tecnologia, um químico poderá desenvolver 100 compostos novos por ano, a um custo reduzidíssimo.

Espera-se muito mais inovação tecnológica na área dos medicamentos. Recentemente, foram desenvolvidos métodos que geram, em tempo real, um verdadeiro videoclipe sobre efeitos de uma droga. Por exemplo, foram filmadas moléculas enzimáticas em pleno processo de catálise. A resolução desta tecnologia é enorme. Nos cliques animados os cientistas foram capazes de observar os movimentos de átomos individuais nas moléculas atuantes. O próximo passo será capturar, em imagens, passo a passo, a ação de uma droga – reação que na maioria das vezes ocorre em uma fração do segundo – ligando-se a um receptor responsável por uma patologia. Esta tecnologia congela, literalmente, o processo do medicamento em cada fase de sua ação. A parte mais difícil nesta etapa é correlacionar o tempo correto para observar cada fase da atividade do fármaco.

Pelo desenvolvimento da sequência animada do efeito do medicamento sobre moléculas específicas, os pesquisadores acreditam que estão detectando uma

intricada dança da vida, em nível molecular. Este método representa mais que o desenvolvimento de uma técnica sensível para flagrar o bailado dos átomos, ele transforma o paradigma da formulação de um medicamento. Com esta técnica, identificam-se, com precisão, quais regiões da molécula são ativas e, para melhoria do efeito da droga, quais os radicais moleculares poderão ser alterados. Ou seja, utilizando-se este método, pode-se desenhar novas drogas para agir em locais específicos ou em configurações críticas, aperfeiçoando a eficiência de um fármaco. Esta tecnologia, aliada à química combinatória e a laboratórios 'robotizados', poderá desenvolver substâncias que inibirão etapas cruciais do balé das moléculas, diminuindo os indesejáveis efeitos colaterais que, em alguns casos, podem ser debilitantes e fatais, quase sempre anulando a possibilidade de novas terapias.

Também estão sendo desenvolvidas técnicas que revelam os genes em ação. Utilizando embriões de galinha e corantes fluorescentes de diferentes cores, pesquisadores demonstraram que é possível observar a atividade simultânea de três genes e visualizar, com mais detalhes, como os embriões se desenvolvem. Quando dois ou três genes são ativados no tecido, ou na célula, as cores fluorescentes se combinam para formar uma nova cor. Genes marcados em vermelho e verde formam uma imagem amarela. Se os genes forem marcados com vermelho e azul formam a cor púrpura. Combinando genes marcados com azul e verde aparece a cor turquesa. Quando os três genes marcados em vermelho, verde e azul são ativados, produzem uma imagem branca. O método associa e expande três tecnologias existentes para detectar genes:

- 1) Hibridização *in situ*, uma técnica para detectar material genético (DNA e RNA) em uma única célula;
- 2) Imunoquímica, na qual anticorpos detectam antígenos que podem se ligar aos genes;
- 3) Sinal de amplificação da tiramida, na qual se amplificam corantes fluorescentes que podem ser vistos quando iluminam os genes.

A técnica do uso de corantes fluorescentes permite a combinação de imagens do embrião em duas dimensões, num computador, para desenvolver uma imagem tridimensional que pode ser manipulada para examinar, por exemplo, a relação entre o desenvolvimento dos tecidos e órgãos. Este conhecimento possibilitará investigar medicamentos que agem em nível genético com muito mais eficiência. Espera-se que nos próximos dez anos, com a simulação em computadores do movimento das moléculas, das novas variações moleculares, dos análogos

estruturais, e a revelação dos genes em ação, um químico possa desenvolver milhares de novos fármacos que podem agir em pontos específicos do metabolismo ou diretamente nos genes.

Prognóstico e Diagnóstico Molecular

A medicina teria caminhado além das maravilhas observadas se os avanços biológicos dramáticos, que ocorreram nas últimas duas décadas, tivessem atendido as esperanças originais criadas nas cabeças dos cientistas. As doenças poderiam ser curadas pela inserção de novos genes ou células modificadas nos pacientes. Por exemplo, a sequência dos genes poderia ser utilizada para desenvolver novas drogas. Entretanto, a medicina baseada em genes é, sem dúvida, um alvo no horizonte, mas a distância para alcançá-lo ainda é grande. A indústria acredita que é difícil desenvolver novas drogas antes da compreensão total dos processos biológicos envolvidos na doença. Mas a medicina é complexa e, infelizmente, compreendemos somente uma pequena parte da biologia humana.

Nesta área, a ciência caminha lentamente. Sete anos após o nascimento da ovelha Dolly, e um ano após a sua morte, ainda não existe uma tecnologia consistente e confiável para clonar animais, com garantia de serem saudáveis. Mesmo na investigação das células-tronco, os estudos estão complicados. Injetar tais células nos seres humanos pode ser perigoso. Mesmo se no laboratório o experimento funcionasse não se sabe se seria uma boa idéia usar as células-tronco para tornar um produto viável.

Mas mesmo com estes questionamentos, continua o desenvolvimento de novas drogas. Senão vejamos: a indústria farmacêutica tem procurado uma estratégia inovadora para produzir novos *kits* para detecção de doenças e novas drogas. O primeiro ponto importante foi a conclusão de que, para entender uma doença, é necessário conhecer genética e biologia molecular. Ou seja, fazer uma correlação entre as patologias e os genes envolvidos. Uma nova aplicação da técnica de microarranjos, onde milhares de genes são colocados numa simples lâmina, está sendo desenvolvida para comparar os perfis genéticos de diferentes tecidos ou órgãos e revelar quais genes estão ativos ou são responsáveis por uma determinada doença.

A herança genética é randômica porque é impossível prever, precisamente, quais genes, entre os 50% de origem materna e os 50% de origem paterna, são provenientes do pai ou da mãe. Por causa disto, é extremamente raro, mas

teoricamente possível, que irmãos não tenham coincidências e similaridades genéticas. Uma das heranças paternas transmitidas geneticamente aos filhos é a diabetes. Esta doença é grave e pode levar a ataques cardíacos, derrames e deficiências de circulação, podendo ainda causar alterações da visão, provocando a cegueira. São também comuns, nas diabetes, complicações renais e nervosas.

Os cientistas têm estudado inúmeras seqüências genômicas para investigar os elementos que controlam a atividade do genoma. Entretanto, devido a estas constituírem somente um pouco mais que uma lista estática de substâncias químicas, como se fosse uma lista de peças para construção de um avião 747, a atenção tem sido voltada para a questão de como os organismos vivos controlam a atividade genética. A chave para esta compreensão, ou seja, de como o genoma é controlado são os reguladores genéticos, também conhecidos como fatores de transcrição.

Estas pequenas moléculas se ligam intermitentemente em regiões do DNA, próximas a um gene em particular, e então ativam a função gênica. Elas também podem influenciar a quantidade de proteínas que o gene produzirá via RNAm. O problema é que somente poucos desses reguladores têm sido identificados nos organismos, pois são difíceis de serem localizados. Os genes reguladores se ajustam a um pequeno pedaço da fita de DNA, fazem sua função, e então desaparecem. Devido ao tamanho do genoma, a localização de um gene regulador com as técnicas convencionais de laboratório é praticamente impossível.

Um novo método de varredura do genoma humano para detectar a relação doença e genética identificou mutações associadas com a diabetes tipo 2. Esta técnica analisa a relação entre os genes e a doença, focalizando os genes reguladores e os fatores de transcrição. Estes são proteínas que se ligam em áreas específicas do genoma e coordenam as ações de certos genes. Para descobrir como um fator de transcrição específico contribui para uma certa doença, é necessário localizar no genoma cada região onde o fator atua, identificar os genes deste segmento do DNA e entender como mutações nestes genes, ou defeitos neste processo, podem causar a doença.

Foram detectados vários fatores de transcrição localizados em tecidos pancreáticos e hepáticos, órgãos associados a diabetes do tipo 2. Este estudo mostrou que um fator de transcrição, chamado HNF4, controla cerca de 50% dos genes necessários para o desenvolvimento do fígado e do pâncreas. Isto sugere que, sem este fator, os órgãos não funcionam normalmente. O fator HNF4 possui várias mutações que predis põem uma pessoa a diabetes do tipo 2.

Uma pequena mudança na função do fator HNF4 pode afetar a saúde do pâncreas. Assim, em poucos anos, poderá ser possível desenvolver medicamentos que previnam a diabetes em indivíduos de risco e realizar diagnóstico e prognóstico para saber a probabilidade de uma pessoa vir a ter esta doença.

Compreender como os processos biológicos são regulados é um enfoque recente para investigar as doenças. Por exemplo, a compreensão do mecanismo de controle genético da divisão celular é importante para a pesquisa de doenças como o câncer, onde as células se dividem de modo descontrolado. Ao mesmo tempo, oferece novas possibilidades e estratégias para terapia.

Quando a célula está funcionando normalmente, ela reconhece os sinais químicos que induzem os processos metabólicos. Ao interpretá-los corretamente e traduzir códigos (instruções genéticas) contidos em seu DNA, centenas de proteínas são produzidas, as quais levam o organismo a funcionar normalmente. Em algumas doenças, a célula perde a capacidade ou torna não específica a habilidade de reconhecer estes sinais, o que leva a uma instrução genética aberrante e à produção descontrolada de proteínas.

Os cientistas desenvolveram o menor computador jamais imaginado, feito de DNA, que pode ser utilizado, automaticamente, no diagnóstico e tratamento doenças. Este aparelho, que está sendo testado em laboratório, é tão pequeno que um trilhão deles caberia em uma gota de água, podendo ainda demorar décadas para vir a ser usado na prática. Mas nos faz prever um futuro onde as tecnologias operam dentro do organismo, detectando e tratando de doenças, mesmo antes de elas apresentarem sintomas. Este computador, uma solução de DNA e enzimas, está programado para detectar RNAs que poderiam estar presentes em genes particulares, associados a doenças, se estiverem ativos. Por exemplo, o computador detecta que dois determinados genes estavam ativos e dois outros inativos, e, assim, faz o diagnóstico de câncer de próstata.

Os testes genéticos podem determinar a susceptibilidade de um indivíduo para câncer, doença cardíaca, diabetes, mal de Alzheimer e fibrose cística, entre outras doenças. A esta lista, quase que diariamente, outras patologias são acrescidas. Mas esta promessa está temperada pelo risco de que a herança genética seja usada contra o próprio indivíduo. As pessoas compreendem que os testes genéticos podem identificar predisposições para uma variedade de doenças. Algumas acreditam demais no poder preventivo desta tecnologia. De fato, somente uns poucos testes podem prever se um indivíduo desenvolverá ou não determinada doença. No entanto, ainda há um sério debate ético sobre o uso desta tecnologia e a legitimação da informação genética em vários países.

O Sensor Biológico

O ataque cardíaco, também conhecido como infarto do miocárdio, normalmente ocorre quando é reduzido ou severamente bloqueado o suprimento de sangue que irriga o coração e as células do músculo cardíaco não conseguem oxigênio suficiente para suas demandas metabólicas. Estas células morrem se não são supridas com oxigênio. Um novo tipo de terapia gênica, que responde especificamente ao músculo cardíaco com baixo teor de oxigênio, pode proteger contra lesões decorrentes de um infarto.

Esta terapia está baseada em um sensor biológico que ativa os genes protetores quando os sinais de deficiência de oxigênio sugerem um ataque cardíaco. Estes genes são desativados quando o fluxo sanguíneo restabelecer níveis adequados de oxigênio no coração. Em camundongos com ataques cardíacos, este sensor, regulado pelo teor tecidual de oxigênio, protege contra lesões as células do miocárdio.

Nestes experimentos, a terapia gênica, para limitar as lesões iniciais e prevenir novos problemas no órgão, foi realizada após o primeiro ataque cardíaco. Este novo conceito de terapia pode ser um tratamento alternativo à utilização de *cents* ou cirurgias de pontes de safena. Não é raro que o indivíduo que sofre um ataque cardíaco tenha outro ataque subsequente.

Freqüentemente, a diminuição do fluxo sanguíneo do músculo do coração, conhecida como isquemia, não causa dor ou outro sintoma marcante. Esta isquemia silenciosa ou assintomática pode levar a um segundo ou terceiro ataque cardíaco sem sintomatologia. Efeitos repetidos da isquemia no miocárdio provocam lesões cumulativas no coração que podem culminar em um ataque cardíaco fatal. Desse modo, o que o paciente necessita é uma terapia gênica estratégica capaz de agir nas células cardíacas, ativando ou desativando genes específicos. Ou seja, as proteínas terapêuticas serão produzidas somente quando e onde forem necessárias.

Um dos aspectos mais importantes deste enfoque está na habilidade de vincular diretamente genes potencialmente terapêuticos a um estímulo patológico associado a uma isquemia no miocárdio. Esta linha de pesquisa deságua em um modo de desenvolver terapias inteligentes para o coração, levando o tratamento precoce e rápido a uma variedade enorme de doenças cardíacas.

A terapia gênica é uma técnica que envolve a inserção de genes em um vetor, normalmente um plasmídeo, para corrigir genes anormais ou defeituosos. Os pesquisadores desenvolveram uma molécula, batizada como vetor vigilante, que é um detector sensível dos níveis de oxigênio e pode aumentar ou diminuir

a expressão de genes da oxigenase heme-protetora 1 (HO-1). Este plasmídeo foi inoculado diretamente nos músculos cardíacos de camundongos, uma hora após os animais sofrerem ataques cardíacos. Dez dias após, os camundongos que receberam os sensores biológicos que regulavam a terapia gênica apresentaram menos lesões nas células cardíacas e melhores recuperações da função bombeadora do coração quando comparados a camundongos injetados com salina. Os genes protetores HO1 agiram evitando mortes das células da musculatura cardíaca e limitando a área tecidual da lesão.

Recentemente, um 'nanobiosensor' foi desenvolvido para estudar o ambiente intracelular. Este dispositivo é uma sonda de fibra ótica de 40 nanômetros de diâmetro, suficientemente fino para ser inserido no interior de uma célula. O aparelho é imobilizado em uma molécula biorreceptora, como um anticorpo, DNA, RNA ou enzima, que pode aderir na molécula-alvo, no interior da célula.

O biosensor pode ter inúmeras aplicações. A habilidade de trabalhar em células vivas abre novas oportunidades de investigação básica para entendimento de processos celulares, por exemplo, como compostos tóxicos e microorganismos patogênicos modificam o sistema biológico celular. Também pode auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos com mais segurança, proteção e compreensão de sua ação no interior da célula.

Vacinologia Moderna: os próximos passos

Após o dia 12 de fevereiro de 2001, quando o mundo tomou conhecimento que a sequência do genoma humano tinha sido desvendada, uma revolução silenciosa começou a ocorrer no campo da genética. Esta nova maneira de olhar os genes refletiu mudanças hercúleas na área médica. Vários aspectos da clínica médica e dos serviços de saúde serão modificados com o desenvolvimento da biotecnologia baseada na genômica e na proteômica.

A prática da saúde pública será beneficiada pelo desenvolvimento de diagnósticos mais precisos para um número mais variado de enfermidades, bem como pelos novos fármacos para controle de doenças. Detectaram-se mais de 30 mil genes e sabe-se que 0,1% da sequência do genoma humano responde pelas diferenças entre os indivíduos. Estas diferenças poderão determinar se uma pessoa está predisposta a uma doença específica e o que poderá ser feito para preveni-la, ou até mesmo prever reações secundárias quando for usado um medicamento específico.

Este conhecimento levará a mais do que uma revolução na área médica, pois também terá conseqüências na economia, na política, nas técnicas reprodutivas, nas novas drogas, nos medicamentos imunobiológicos e na qualidade e expectativa de vida do cidadão. É muito provável que novos medicamentos desenvolvidos com base na genômica e proteômica sejam utilizados para o tratamento de doenças hoje tidas como de difícil terapia. Hoje, as empresas biotecnológicas produzem cerca de 140 medicamentos e vacinas. Com o uso da tecnologia da genômica outros 350 produtos destas indústrias estarão chegando ao mercado ainda neste ano.

Dentre as tecnologias atuais para produção de vacinas, destacamos a vacina viva viral (e bacteriana) atenuada, que mimetiza a infecção natural e induz repostas humoral e celular, e a vacina de vírus (e bactéria) inativado, que revolucionou o controle de doenças infecciosas no século XX e, certamente, será uma tecnologia importante neste novo século. Vacinas baseadas em proteínas, peptídeos, polissacarídeos e até vacinas de DNA estão sendo desenvolvidas.

As prováveis novas vacinas imunizarão contra citomegavírus, Aids, doenças meningocócicas, Alzheimer, abuso de drogas, HPV, peste, certos tipos de câncer, *Escherichia coli*, doença de Lyme, hepatites, *Clamídia*, *Helicobacter*, tuberculose, febre amarela, dengue, malária, resfriado comum, influenza, entre outras doenças. Novas formas de aplicação de medicamentos estão sendo testadas. Em breve, ao usar sabonetes, pastas de dente, cosméticos, aerossóis e alimentos, uma pessoa poderá estar tomando sua dose diária de medicamentos ou de vacinas. Em breve, será descartada a necessidade de refrigeração para preservar vacinas.

Numa projeção mais ousada, a terapia do futuro poderá reconstruir lesões, tecidos doentes, deficiências fisiológicas, estimulando o organismo a reconstruir a si próprio. Plantas serão transformadas geneticamente para expressar princípios ativos específicos. Por exemplo, vegetais transgênicos já produzem vacinas contra tétano, difteria, hepatite B e cólera. Ovelhas já produzem leite com anticorpos e proteínas humanas que combatem doenças, principalmente associadas a deficiências na coagulação sangüínea. Insetos transgênicos poderão tornar-se vacinadores naturais, verdadeiras seringas voadoras, pois em suas salivas estarão presentes antígenos contra inúmeras doenças.

Um dos próximos passos será o domínio tecnológico que dará um novo enfoque para a área dos imunobiológicos – a vacinologia reversa. Utilizando o conhecimento disponível, estão sendo desvendadas seqüências de genes de microorganismos patogênicos para desenvolverem moléculas que são candidatas

potenciais a novas vacinas. Um belo exemplo da utilização desta tecnologia está no rápido seqüenciamento do genoma do vírus causador da síndrome respiratória aguda (Sars) e na velocidade que esta informação genômica forneceu moléculas para desenvolvimento da vacina contra esta doença.

O desenvolvimento convencional das vacinas leva em conta que os microorganismos são cultivados no laboratório, para obtenção de proteínas ou outras moléculas que estimulem o sistema imunológico a produzir anticorpos. É um trabalho longo e demorado, mesmo sem ainda levar em conta que alguns agentes patogênicos não se desenvolvem em culturas. Para acelerar este processo, os pesquisadores já estão se preparando para o domínio da genômica-reversa. Mas, o que vem a ser esta tecnologia? Sabe-se que as vacinas apresentam, ao sistema imunológico do indivíduo, moléculas que informam que o organismo precisa se defender contra a invasão real de um agente infeccioso.

Recentemente, foram divulgados os estudos de genomas de 150 bactérias e 1.600 vírus que estão sendo seqüenciados e disponibilizados para a comunidade científica. Nos bancos de dados desses genomas pode-se encontrar genes de proteínas interessantes, que são expressas na superfície destes microorganismos. Estes genes podem ser inseridos em bactérias, por exemplo, na *Escherichia coli*. Estas bactérias transgênicas, além de suas proteínas, produzirão as moléculas baseadas nas instruções genéticas dos genes inseridos. Após serem isoladas, as proteínas escolhidas poderão ser testadas em animais. Esta é a vacinologia-reversa, que pode realizar em poucos meses testes que, pela metodologia convencional, poderiam demorar mais de 30 anos.

Um outro belo exemplo é o da vacina contra a varíola. Recentemente, os pesquisadores produziram a vacina usando apenas quatro genes do vírus *vaccinia* (responsável pela varíola bovina), o mesmo vírus usado na produção da vacina licenciada contra a varíola humana. Normalmente, esta vacina contém o vírus amortecido, o que leva a um potencial enorme de indução de sérios efeitos colaterais, às vezes levando a mortes.

Esta vacina é suspeita de causar inflamação cardíaca e, no passado, podia causar a morte de duas a cada 1 milhão de pessoas vacinadas. Indivíduos com imunodeficiência estão sempre em risco quando vacinados contra varíola. No entanto, a vacina de DNA não causou efeitos adversos. Como os vírus são muito parecidos geneticamente, é possível encontrar uns poucos genes que protegerão os seres humanos, bem como os animais, contra estes três tipos de viroses: varíola humana, bovina e de macaco.

Nesta investigação, os primatas foram divididos em quatro grupos, o primeiro contendo macacos inoculados com a vacina antivariola clássica. Um outro grupo, com macacos injetados com a vacina de DNA contra a varíola, contendo apenas um único gene, chamado L1R. Um terceiro continha macacos inoculados com uma vacina de DNA contra o *Hanta* vírus. E um último, o grupo-teste, consistindo de macacos tratados com a vacina produzida com quatro genes. A técnica da vacina de DNA envolve imunização com plasmídios, o que codifica um ou mais genes do vírus. Quando o plasmídio é introduzido em uma célula, o gene clonado é expresso e as proteínas codificadas são apresentadas ao sistema imune que inicia a produção de anticorpos protetores contra o vírus.

O resultado deste experimento demonstrou que, após uma injeção letal do vírus da varíola de macacos, os animais vacinados com a vacina clássica não apresentaram sinais clínicos da doença e, conseqüentemente, não morreram. Entretanto, os primatas vacinados contra *Hanta* vírus morreram 7 a 14 dias após o desafio, como conseqüência da inoculação do vírus.

Os animais que foram inoculados com a vacina de DNA L1R tornaram-se portadores da doença, mas recuperaram-se, sugerindo que este gene conferiu alguma proteção. Os *Rhesus* imunizados com a vacina de DNA 4-genes não foram somente protegidos contra a letalidade do vírus, mas também não apresentaram a doença em sua forma mais severa.

Nos últimos 25 anos, a varíola foi erradicada como uma doença natural humana. Assim, as licenças de futuras moléculas que se candidatam a vacinas são obtidas somente quando se utilizam os primatas não-humanos para testes. Entretanto, com a ameaça do bioterrorismo, a produção da vacina molecular é fundamental para dar segurança à humanidade. Na vacinologia reversa, os pesquisadores utilizam supercomputadores (algoritmos bioinformáticos) para responder a questões específicas envolvendo a comparação de vários genomas e proteomas de agentes infecciosos e suas possíveis respostas imunes.

Numa visão de futuro, com estes supercomputadores, gastaríamos somente algumas poucas horas para resolver problemas genômicos e proteômicos complexos, que necessitariam de anos de estudos em laboratórios caríssimos, planejados para ter uma segurança biológica impecável contra agentes patogênicos e outros micróbios perigosos.

Estudando genomas e proteomas de patogênicos múltiplos, observando as similaridades ou 'homologias' entre as proteínas expressas na superfície de várias espécies de microorganismos e o tempo evolucionário, pode-se escolher ou

prever com maior segurança quais são os genes e as proteínas candidatas prováveis à vacina. Com este conhecimento será possível desenvolver um vacina totalmente sintética.

A evolução das metodologias para produção de novas vacinas

A área do desenvolvimento tecnológico na produção de metodologias para criação de novas vacinas evolui de uma forma muito rápida, senão vejamos:

1. Pesquisadores australianos divulgaram, em outubro de 2004, nos *Proceedings of the National Academy of Sciences*, a criação de uma vacina sintética efetiva contra vírus, bactérias patogênicas e tumores, e que pode gerar um novo arsenal de vacinas para os seres humanos e animais. A vacina sintética oferece uma série de vantagens se comparada às vacinas tradicionais. Por exemplo, enquanto a vacina tradicional contém pequenas quantidades de vírus vivo ou atenuado, a vacina sintética não possui nenhum material infeccioso. A vacina sintética pode ser produzida em larga-escala de maneira econômica e não apresentar efeito colateral. Ou seja, ela é planejada para tipos de alvos específicos da reação imunológica. Assim ela pode, de um lado, ativar a produção de anticorpos; de outro, estimular a resposta imune celular. As primeiras tentativas de desenvolver vacinas baseadas em peptídeos sintéticos fracassaram devido à fraca resposta de produção de anticorpos. Agora, para resolver este problema, os pesquisadores adicionaram uma estrutura lipídica para aumentar a capacidade para indução de anticorpos. Assim, a nova vacina sintética se baseia em uma simples estrutura composta de dois epitopos: a) pequenas seqüências de peptídeos que são reconhecidas pelo sistema imunológico; b) uma estrutura lipídica que age como identificadora de alvo – uma particular célula no organismo – para a vacina. A adição do lipídio amplifica enormemente o resultado da resposta imune.

2) Pesquisadores também estão trabalhando em desenvolvimento de novas tecnologias para vacinas e imunoterapia para câncer. Até o início dos anos 80, a tendência da tecnologia das vacinas era a purificação do princípio ativo. Por exemplo, a vacina contra hepatite B não era produzida utilizando-se parte do vírus, e sim uma única proteína da superfície do vírus da hepatite B. Agora, a nova maneira de pensar é que, para inúmeras doenças, é necessária uma resposta imunológica complexa envolvendo elementos do sistema imune como as células T, células B, que produzem anticorpos, e citoquinas, que são moléculas que induzem as células T e B a realizarem seus trabalhos. É como uma orquestra

sinfônica executando um clássico. Para isto não são necessários somente violinos e piano, há que se ter outros instrumentos de sopro e percussão. No desenvolvimento de uma vacina contra câncer, por exemplo, não se utiliza somente o gene que seja o antígeno do tumor, mas também se usa um gene que codifica uma citocina. Com isto, aumentará a resposta imunológica desejada. Este é um fato novo porque até agora ninguém desenvolveu uma vacina baseada somente na resposta celular. Explicando melhor, vamos imaginar doenças que possuem vacinas como o sarampo e a varíola. Estas vacinas estão baseadas na produção de anticorpos que atacam o vírus diretamente. As vacinas que produzem uma resposta celular não destroem o agente patogênico; elas agem destruindo as células infectadas pelos microorganismos. Estas poderão ser células infectadas por um vírus, como o do HIV ou uma célula cancerígena, que de alguma maneira são reconhecidas pelo sistema imune celular. Por exemplo, quando um vírus contamina uma célula, interfere no sistema de síntese de proteínas, fazendo que esta célula produza também proteínas virais. Partes dessas proteínas podem aparecer do lado externo da célula, levando as células T a reconhecê-las e identificando-as como proteínas estranhas. Assim, as células T destroem as células que expressam estas proteínas. Esta nova tecnologia poderá colocar em uma mesma vacina a resposta de destruição celular e a resposta com produção de anticorpos. Este tem sido o foco mais pragmático desta nova tecnologia para produção de agentes vacinais.

3) A diabetes é um tipo de doença grave aparentemente resultante de uma predisposição genética causada por fatores ambientais desconhecidos que levam a uma resposta auto-imune. Esta doença se manifesta de duas maneiras: a diabetes do tipo 1, que ocorre geralmente em pessoas com menos de 40 anos quando as células pancreáticas, chamadas de células beta, produtoras de insulina, são destruídas; e a diabetes do tipo 2, que geralmente ocorre em pessoas mais idosas quando o organismo não responde normalmente ao hormônio ou não produz a insulina em quantidade suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue. Os cientistas britânicos estão investigando o uso de células-tronco, transplante de órgãos, regeneração celular e também drogas novas e vacinas para terapia, procurando restabelecer a habilidade de o organismo produzir insulina. O único tratamento desta doença nos últimos 80 anos ainda é a injeção diária de insulina. A Bristol University e o King's College de Londres estão desenvolvendo uma vacina contra esta doença. Esta vacina já está sendo testada, desde agosto de 2004, em 18 pacientes com o tipo da diabetes 1. O início dos testes nos seres humanos marcou um dos mais importantes avanços na luta

contra a doença desde a prescrição de insulina recomendada a partir de 1920. Este novo tratamento pode agir como uma vacina e uma cura. Pessoas que possuem familiares com risco de diabetes podem ser vacinadas para prevenir aparecimento da doença, e aquelas que foram diagnosticadas recentemente como diabéticas podem bloquear o seu progresso, pois, em média, o organismo demora cinco anos para cessar a produção de insulina. No entanto, infelizmente, os pacientes portadores da doença não se beneficiarão desta vacina em curto prazo. Os pesquisadores ingleses iniciaram o estudo em seres humanos, após o sucesso do tratamento de camundongos, que foram inoculados com uma proteína, isolada do sangue de camundongo e que é uma molécula idêntica a uma parte das células beta produtoras de insulina. Esta estrutura adicionada ao sangue impedia o organismo de destruir estas células. Os animais diabéticos foram protegidos da doença pelo resto de suas vidas. Estudando amostras de sangue humano, os cientistas identificaram uma proteína que apresentava uma sequência equivalente à observada em camundongos. A vacina desenvolvida contém um peptídeo com sequência semelhante, e que, quando adicionada ao sangue, protege as células produtoras de insulina contra a ação agressiva do organismo. Este tipo de tratamento foi um sucesso em camundongos e espera-se agora o mesmo nos testes com os seres humanos.