

Ferramentas de análise molecular e os agentes das grandes endemias

Molecular analysis tools and the agents of great endemic diseases

Samuel Goldenberg ¹

Abstract *Recent developments in the field of molecular biology pave the way for the study, diagnostics and therapeutics of endemic diseases that affect mainly developing countries. Gene manipulation techniques allow the large scale expression of pathogen genes with a potential use in diagnostics or vaccine production. In addition, these techniques might result in new attenuated vaccines. On the other hand, the determination of the nucleotide sequence of the genome of pathogens might lead to new targets for drug rational design with a potential use in chemotherapy. However these progresses will not be available to developing countries unless a continuous program for research funding and human resources formation in these new technologies is adopted.*

Key words *Biotechnology, Molecular Analysis, Endemic Diseases*

Resumo *Os desenvolvimentos recentes no campo da biologia molecular abrem novas perspectivas para o estudo, diagnóstico e terapêutica das grandes endemias que afetam sobretudo as nações em desenvolvimento. As técnicas de manipulação de genes permitem a expressão de antígenos de patógenos em larga escala, com a potencial utilização como reagentes para diagnóstico ou imunógenos. Adicionalmente, essas técnicas poderão levar à obtenção de novas vacinas vivas atenuadas. Por outro lado, a determinação da sequência dos genomas de patógenos poderá levar a novos alvos para o desenho racional de drogas com potencial quimioterápico. Entretanto, esses avanços só estarão à disposição dos países em desenvolvimento se houver um programa contínuo de investimento e de formação e valorização de recursos humanos competentes nessas novas tecnologias.*

Palavras-chave *Biotecnologia, Análise Molecular, Doenças Endêmicas*

¹ Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBPM) e Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Rua Algacyr Munhoz Mader, 3.775 81350-010 Curitiba PR. sgoldenb@tecpar.br

Introdução

As condições de saúde da população mundial podem ser paradoxais. Enquanto em alguns países a expectativa de vida da população ultrapassa os 80 anos, em muitos outros ela mal chega aos 40 anos (Singer & Daar, 2001). No caso de grande parte dos países em desenvolvimento, as desigualdades sociais e as políticas de governo em saúde descontinuadas acabam gerando uma situação caótica, onde convivem indivíduos portadores de enfermidades típicas das populações dos países desenvolvidos e indivíduos portadores de doenças já erradicadas ou inexistentes naqueles países. Exemplificando, em um grande centro urbano, como a cidade de São Paulo, temos indivíduos com insuficiência cardíaca provocada pelo estresse e pela alimentação rica em lipídios convivendo com pacientes com insuficiência cardíaca provocada pela doença de Chagas.

Todavia, a saúde pública pode dar um importante salto qualitativo pelo uso de ferramentas poderosas desenvolvidas na última década com o emprego de técnicas da biologia molecular. As técnicas de clonagem e de expressão de genes permitiram grandes avanços para a produção de reagentes para diagnóstico e vacinas, enquanto as técnicas de amplificação de DNA permitiram consideráveis progressos no diagnóstico de enfermidades congênitas e doenças causadas por patógenos de diferentes naturezas. Mais recentemente, com a maior difusão da técnica de microarranjos de alta densidade ou “*chip* de DNA”, novas perspectivas se abrem para o diagnóstico molecular para estudos relacionados à resistência de patógenos a drogas e para o campo da farmacogenômica.

Diagnóstico

O diagnóstico preciso e rápido é essencial para várias doenças, tanto para permitir uma eventual quimioprofilaxia, como para evitar sua disseminação. A transmissão e aquisição de patogenias por via transfusional é de extrema relevância para a saúde pública. Houve recentemente, na Ásia, a notificação de mais de 500 mil casos de pacientes infectados com o vírus HIV por terem doado ou recebido sangue com agulhas contaminadas (Cohen, 2001). Aqui mesmo, no Brasil, tivemos um grande número de hemofílicos que contraiu Aids por transfusão com sangue contaminado. A transfusão é o

segundo mecanismo mais importante para a aquisição da doença de Chagas (Dias & Schofield, 1999), e, há alguns anos, os casos de aquisição de doença de Chagas por via transfusional suplantavam em nosso país os novos casos por infecção com o inseto vetor, vulgarmente conhecido como barbeiro. Foi somente com a obrigatoriedade do controle do sangue pelos bancos de sangue estatais que esse quadro pôde ser parcialmente controlado (Moraes-Souza, 1999).

Em geral, o diagnóstico de doenças teve um grande avanço nos últimos anos com a técnica de PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) (Weiss, 1995). A reação de PCR permite que uma dada seqüência de ácido nucléico (geralmente, DNA ou então um RNA que deve ser previamente copiado numa molécula de DNA, pela técnica de RT-PCR) seja amplificada milhares de vezes mediante o uso de reagentes adequados; pequenas seqüências de DNA (oligonucleotídeos) complementares ao DNA-alvo que se quer amplificar que uma vez hibridadas com a seqüência alvo através da complementaridade do pareamento de bases do DNA são copiadas milhares de vezes com a enzima DNA polimerase extraída de bactérias termo-resistentes. Após a execução de vários ciclos de amplificação a elevadas temperaturas, o produto final obtido é a molécula-alvo amplificada milhares de vezes, permitindo sua detecção e caracterização. Hoje em dia, há um grande número de testes para diagnóstico comercialmente disponível que utiliza a tecnologia da PCR.

A técnica de PCR, entretanto, pode não ser adequada para o diagnóstico de doenças, nas quais o parasita apresenta a estratégia de permanecer oculto em algum órgão ou tecido, deixando a infecção em estado latente, tal como ocorre na fase indeterminada da doença de Chagas. Além disso, para o diagnóstico de um grande número de amostras – bancos de sangue, por exemplo – ou para o trabalho com amostras no campo, as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos não são apropriadas tanto pela dificuldade de automação como pelo custo intrínseco dos testes. Assim, a opção é a utilização de testes sorológicos, preferencialmente o teste de ELISA, tanto pela especificidade e sensibilidade do mesmo como pela possibilidade de automação. A qualidade dos testes de ELISA melhorou nos últimos tempos graças ao uso de antígenos recombinantes, aumentando sua especificidade.

Vários kits comerciais para diagnóstico, que utilizam a PCR, foram desenvolvidos, sendo amplamente utilizados por laboratórios de análises clínicas (Pfaller, 2001). Apesar das desvantagens mencionadas para o uso da PCR, a precisão no diagnóstico positivo não deixa dúvidas, permitindo a pronta intervenção do clínico. Adicionalmente, essa metodologia é bastante adequada para a detecção de genes de resistência a drogas em patógenos, permitindo que se ataque de maneira mais precisa os casos de infecção persistente ou infecção hospitalar. No caso de algumas moléstias causadas por vírus, a utilização da PCR é importante não apenas para a detecção, mas para a mensuração da carga viral. De fato, a decisão de se iniciar um tratamento ou mesmo a dosagem do quimioterápico depende da carga viral. O procedimento é particularmente relevante no caso da Aids, um dos grandes problemas de saúde pública mundial.

Algumas moléstias são causadas por microorganismos que não podem ser cultivados facilmente ou que levam longos períodos para crescerem em cultura, como é o caso de micróbactérias que causam a hanseníase ou a tuberculose, ou ainda o *Helicobacter pylori* associado a vários tipos de úlcera. Nesses casos, as técnicas de amplificação são úteis não apenas para o diagnóstico mas também para a tipagem do patógeno ou até para evitar intervenções cirúrgicas (no caso de úlcera).

Vacinas

Estima-se que a próxima década trará grandes desenvolvimentos na área de vacinas. A produção de antígenos vacinais por técnicas de DNA recombinante e a conjugação de múltiplos antígenos permitirão a multivacinação em uma única dose. Assim, é essencial que os países em desenvolvimento invistam recursos para a formação de recursos humanos capacitados nas novas tecnologias para que possam desenvolver os produtos de que necessitam para sanar os problemas de saúde regionais. Duas abordagens interessantes do ponto de vista tecnológico poderão ganhar a escala industrial. Uma delas é a vacinação via DNA (Gurunathan *et al.*, 2000). No caso de vacinas DNA, a imunização é feita pela injeção diretamente com o gene (a sequência de DNA) que codifica um antígeno vacinal. Este DNA, uma vez introduzido nas células do indivíduo, é expresso funcionalmen-

te, resultando na apresentação do antígeno vacinal ao sistema imune do hospedeiro. A grande vantagem dessa vacina é que antígenos que devem sofrer modificações especiais pós-traducionais características de células de eucariotos superiores serão convenientemente processados. O problema que ainda se coloca quanto a esse tipo de metodologia é o risco de integração deste DNA exógeno no DNA do hospedeiro, que pode levar a manifestações de difícil previsibilidade, incluindo a indução de câncer ou ainda a indução de doenças auto-imunes (Robertson & Griffiths, 2001). Todavia, desenvolvimentos importantes estão sendo feitos nessa área e os ensaios com vacinas animais permitirão que se estabeleçam as condições de segurança para a futura imunização de humanos com vacinas DNA.

Uma segunda abordagem interessante trata da obtenção de vacinas vivas com patógenos atenuados. Os avanços recentes na genética molecular de microorganismos (Waters & Janse, 1999) permitem imaginar a obtenção de vacinas vivas, isto é, parasitas modificados geneticamente de tal forma que genes de virulência tenham sido eliminados do genoma, fazendo com que os possíveis antígenos vacinais sejam apresentados ao sistema imune do hospedeiro sem que a doença se manifeste. Como alternativa, há atualmente um grande esforço para a obtenção de insetos vetores de doenças transgênicos (Beerntsen *et al.*, 2000), ou seja, cujos genes foram manipulados de tal forma que o parasita que utiliza o inseto como hospedeiro intermediário não possa mais desenvolver-se no mesmo, eliminando, portanto, o ciclo da doença. Estudos recentes com mosquitos transmissores da malária se mostram bastante promissores. Entretanto, o problema que se coloca nesta última abordagem é a do impacto ambiental de se lançar uma espécie modificada na natureza.

Quimioterapia

Uma grande revolução científica neste novo século é, sem dúvida, a determinação da sequência nucleotídica completa de vários organismos pelos "projetos genoma". A compreensão da organização e funcionamento dos diferentes genomas poderá mostrar vias metabólicas peculiares que serviriam como alvos para o desenvolvimento de drogas específicas (Bentley, 2000). É interessante notar que a análise dos dados ge-

rados com os poucos genomas completados mostra que grande parte dos genes seqüenciados é, na realidade do momento, desconhecida. É muito provável que haja genes que codificam enzimas que poderiam ser alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas. De fato, várias iniciativas, compreendendo projetos genoma de patógenos, estão em curso e a análise funcional dos genes seqüenciados deverá revelar novos horizontes para a melhor compreensão dos mecanismos de patogênese, dos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro e dos mapas metabólicos de patógenos (Carucci, 2001).

Além dos avanços nos projetos genoma, vários esforços estão sendo concentrados nos projetos proteoma que visam mapear e caracterizar a totalidade das proteínas de um organismo. O conjunto de dados gerado, associado com os avanços obtidos na expressão de genes utilizando técnicas de DNA recombinante, permite hoje a obtenção de dados cristalográficos de uma grande quantidade de proteínas (Ashton et al., 2001). De posse desses dados estruturais, pode-se iniciar a verdadeira farmacogenômica, que consiste no desenho racional de drogas. Estas drogas poderiam ser aplicadas, por exemplo, para a quimioterapia de doenças, para as quais não há vacinas disponíveis; e deveriam ser efetivas contra o patógeno e absolutamente inócuas para o hospedeiro.

Um dos problemas relacionados à necessidade de desenvolvimento de novas drogas baseadas em desenho racional é o da existência de patógenos que ao longo dos anos desenvolveram resistência múltipla a drogas, agravando, em muito, o quadro clínico e podendo levar o paciente infectado a óbito. O caso da malária é típico, onde cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina resultam em um grave problema de saúde pública. Grave também é o problema das infecções hospitalares por cepas de bactérias resistentes à metilicina.

Microarranjos de alta densidade: *chips* de DNA

O avanço recente da genômica estrutural, levando à determinação da seqüência dos genes de vários organismos, permitiu o acúmulo de uma enormidade de dados, havendo a necessidade de se compreender a funcionalidade dos genes estocados nos bancos de dados. Atualmente estão sendo desenvolvidas estratégias

que permitem a análise simultânea de milhares de genes e a elucidação de sua possível função pelo estudo de sua expressão ao longo da diferenciação ou desenvolvimento de uma célula ou um indivíduo. Tecnologias apropriadas e novos instrumentos tornam possível colocar em uma simples lâmina de microscópio milhares de genes e analisar a sua expressão em diferentes situações. Esses genes imobilizados são analisados por hibridação com genes isolados das células em estudo em diferentes situações e marcados com fluoróforos de tal maneira que a partir da observação da cor e da intensidade do sinal após a hibridação pode-se estimar a expressão de um gene particular qualitativa e quantitativamente. Essas lâminas com milhares de seqüências gênicas identificáveis e expostas ordenadamente são denominadas de microarranjos de alta densidade, *chips* de DNA ou ainda *biochips* (Schena et al., 1995; Watson et al., 1998; Jain, 2001). O potencial dessa metodologia é fantástico, pois em um simples experimento é possível analisar, por exemplo, os genes que são expressos quando um parasita passa de uma forma não-infectiva para uma forma infectiva, ou ainda os genes que são diferencialmente expressos em células resistentes a drogas, ou ainda que genes das células dos mamíferos têm sua expressão alterada quando a célula é invadida por um patógeno. Assim, espera-se que a compreensão da biologia fundamental de patógenos, bem como a dos mecanismos de patogenicidade, tenha um grande avanço nos próximos anos, resultando no desenvolvimento de novos reagentes para a profilaxia de doenças infectocontagiosas (Cumings & Relman 2000). O avanço nessa área tem sido tão vigoroso que podemos prever que em curto espaço terá disponível no mercado *biochips* que permitirão detectar a propensão de um indivíduo em adquirir certas patologias.

Considerações finais

Os avanços recentes da biologia molecular, da mesma forma que permitem que se ataque de maneira mais racional a compreensão e o tratamento de diversas patologias, podendo ser de grande aplicabilidade no estudo das grandes endemias, podem contribuir para aumentar ainda mais as desigualdades entre as nações desenvolvidas e o resto do planeta. Uma nova revolução está em seu início: a revolução da genômica. Se houver uma política continuada de

apoio ao desenvolvimento científico e à formação de recursos humanos é muito provável que as nações menos desenvolvidas possam não só acompanhar, de maneira competitiva, os avanços das nações economicamente desenvolvidas, mas resolver seus próprios problemas sem a necessidade de pagar ônus exorbitantes à indústria farmacêutica internacional. Ao longo do último século tivemos a revolução industrial, a revolução atômica e a revolução da informática. A revolução da biotecnologia ainda está em seus primórdios e através dela poderemos dar um grande passo para resolvermos os problemas de saúde e alimentação da população brasileira. Se saúde e educação são deveres

do Estado, nos tempos modernos, ciência e tecnologia devem ser somadas a esse binômio. É nossa responsabilidade apresentar soluções para os problemas de saúde que afligem a maior parte de nossa população e, assim, contribuir para diminuir as enormes diferenças sociais da nação. É preciso criar programas voltados para o estudo de nossos grandes problemas de saúde. A universidade brasileira e a comunidade científica como um todo estão, no momento, ociosas frente ao seu potencial, quadro que só será revertido mediante uma política de valorização dos recursos humanos e de fomento continuado e consistente à atividade de pesquisa científica e tecnológica.

Referências bibliográficas

- Ashton PD, Curwen RS & Wilson RA 2001. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends in Parasitology* 17:198-202.
- Beerntsen BT, James AA & Christensen BM 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:115-137.
- Bentley DR 2000. The Human genome project – an overview. *Medical Research Reviews* 20:189-196.
- Carucci DJ 2001. Functional genomic technologies applied to the control of the Human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Pharmacogenomics* 2:137-142.
- Cohen J 2001. HIV gains foothold in key Asian groups. *Science* 294:282-283.
- Cummings CA & Relman DA 2000. Using microarrays to study host microbe interactions. *Emerging Infectious Diseases* 6:513-525.
- Dias JCP & Schofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 103-121.
- Gurunathan S, Klinman DM & Seder RA 2000. DNA vaccines: Immunology, application and immunization. *Annual Review of Immunology* 18:927-974.
- Jain KK 2001. Biochips for gene spotting. *Science* 294: 621-625.
- Moraes-Souza H 1999. Chagas infection transmission control: Situation of transfusional transmission in Brazil and other countries in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:419-423.
- Pfaller MA 2001. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases. Practicality and costs. *Emerging Infectious Diseases* 7:312-318.
- Robertson JS & Griffiths E 2001. Assuming the quality, safety and efficacy of DNA vaccines. *Molecular Biotechnology* 17:143-149.
- Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Singer PA & Daar AS 2001. Harnessing genomics and Biotechnology to improve global health equity. *Science* 294:87-89.
- Waters AP & Janse CJ 1999. The development of and perspectives for genetic engineering of malaria parasites. *Parassitologia* 41:453-459.
- Watson A, Mazumder A, Stewart M & Balasubramanian S 1998. Technology for microarray analysis of gene expression. *Current Opinion in Biotechnology* 9:609-614.
- Weiss JB 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 113-130.