

13°- CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE HANSENÍASE

Haia, Holanda - Set. 1988

UM GUIA PARA SIMPLES MORTAIS PARA A BIOLOGIA MOLECULAR DAS MICOBACTÉRIAS

Barry R. BLOOM. Ph.D.**

"No início era a Palavra e a Palavra estava com Deus, e a Palavra era Deus"

João 1,1.

Não há talvez melhor maneira de transmitir o sentido de profundidade, centralidade, força e prodígio da biologia molecular no contexto da biologia do que recordar as palavras de abertura do Livro de João. A escolha de metáforas absolutamente não tem a intenção de ser blasfêmica; na verdade, curiosamente eu penso que essas palavras podem ser interpretadas mais literalmente do que alguém poderia antecipar. O princípio mais fundamental da genética molecular da nova biologia é o "dogma central" que considera que :

I - O código genético está escrito em moléculas de DNA (ácido desorribonucleico); e

II - Os genes codificam a informação para formar as proteínas por processo de

DNA - transcrição - RNA - tradução -
Proteína

(*) Conferência. Versão em português de:
Dr. Diltor V. A. Opromolla

(**) Departamento de Microbiologia e Imunologia.
Colégio Albert Einstein de Medicina. Bronx. Nova
York 10461. USA.

Para alguns será surpreendente que na concepção moderna da base molecular da hereditariedade se encontrem termos e conceitos como "dogma central", código genético, transcrição, tradução e banco em frases que são usadas todos os dias por biólogos moleculares. Essa consonância entre a mais simples das idéias e a complexidade enorme dos mecanismos, é realmente parte da fascinação da biologia molecular.

O desafio básico da medicina molecular é explicar como a complexidade de um indivíduo, a diversidade de indivíduos dentro de populações, e a evolução das espécies dentro da biosfera podem ser descritas em termos químicos e físicos, e como o potencial para essa diversidade de vida presente inicialmente dentro de uma única célula pode ser realizada. O principal problema evolucionário a ser resolvido era de como "codificar" a informação específica para a hereditariedade em uma ou mais moléculas e como assegurar que aquelas transportando informações genéticas pudessem ser fielmente reproduzidas em cada divisão celular. O DNA representa a solução para esse problema. A característica chave das moléculas de DNA é

que elas têm precisamente a capacidade de se replicar da mesma maneira que as células e os cromossomos se dividem. Isto é possível porque o DNA consiste de duas moléculas complementares, entrelaçadas (conhecidas como heteroduplex) ligadas uma a outra na familiar alfa-hélice. Os biólogos moleculares aprenderam que grandes moléculas de DNA codificam a informação, denominada gene, para todas as enzimas complexas e substâncias químicas que moldam a construção das células em todas as formas de vida e que todas as formas de vida usam basicamente o mesmo código, isto é, a mesma linguagem para criar suas proteínas completamente diferentes.

Em vez das 26 letras do alfabeto romano, o código genético infinitamente mais rico e mais variado usa somente quatro: A, T, C e G. Essas letras representam as bases de ácidos nucleicos, substâncias químicas simples que são quimicamente ligadas para formar grandes moléculas que formam o ácido desoxiribonucleico, ou DNA. A representa adenina; T a timina; G a guanina e C a citosina (citidina). A escolha das quatro bases no DNA permitem a replicação através de um mecanismo extraordinariamente sofisticado e sutil. As quatro bases têm "complementariedade química", isto é, na estrutura tri-dimencional do DNA, A pode se ligar a T, e G pode ligar-se a C. Quando esses longos polímeros das cadeias de DNA estão em solução, o resultado disto é que eles formam estruturas complementares dos dois longos filamentos com "pareamento de bases". Quando uma cadeia se desdobra e enzimas apropriadas estão presentes, bases livres complementares aos filamentos originais podem ser ligadas. Exemplo, uma A livre pareia com T, e uma G livre com C, e então são quimicamente unidas para produzir cópia exata com orientação reversa do filamento original de DNA. Este, é então, um sistema inteiramente auto-replicador que preserva precisamente a fidelidade da informação genética química original.

Talvez devido à necessidade evolutiva de proteger a molécula chave contendo o código genético, o DNA mesmo não é usado diretamente para formar proteínas mas, mais precisamente ele é "transcrito" em outro con-

junto de moléculas menores de ácido nucleico, conhecido como ácido ribonucleico ou RNA, cada uma das quais pode codificar uma ou um pequeno número de proteínas ou polipeptídios. Três das bases usadas para construir o DNA são também usadas no RNA; uma, o uracil, "U", é características do RNA. As bases do RNA ligam-se por complementariedade a trechos de genes do DNA que codificam certas proteínas e são essas estruturas complementares do DNA que realmente fornecem a impressão para produzir a proteína requerida. São as moléculas de RNA que se ligam à maquinária sintetizadora de proteínas das células e que são "traduzidas" em moléculas específicas.

O Código Genético

A questão então é, como quatro simples moléculas químicas permitem a especificação precisa das moléculas de proteínas que são constituídas de até 22 aminoácidos, exatamente na ordem correta para cada proteína? A solução ocorreu na forma de um "código triplo", isto é, três bases são requeridas para especificar precisamente um único aminoácido. Cada triplo das três bases que codificam um único aminoácido é chamado de "codon". Os vários codons formam um dicionário de aminoácidos usados nas proteínas. A universalidade do código significa que essencialmente todas as bactérias, vírus, plantas, protozoários, animais inferiores e o homem usam as mesmas três bases para codificar os mesmos aminoácidos em uma dada posição em uma proteína. Por exemplo, o codon ATG especifica o aminoácido metionina. As moléculas de DNA têm o comprimento de milhões de pares de bases. Por exemplo, o genoma inteiro do **Mycobacterium leprae** tem cerca de 3×10^6 pares de bases enquanto o genoma humano possui cerca de 8×10^9 pares de bases, moléculas bastantes longas de uma única célula, para se estender por 4cm. No entanto as proteínas individuais são muito mais curtas. Para resolver esse problema potencial, o "código" genético tem até "pontuação" isto é codons triplos que especificam o término de uma sequência

proteica, da mesma forma que um período termina uma sentença.

Chance e necessidade

Se o código genético é universal e o código triplo especifica cada um dos aminoácidos através da evolução como pode ocorrer toda a diversidade de vida? Há numerosos mecanismos para o processo de "mutação" genética. Basicamente todos os estudos desde a época de Darwin têm indicado que a alteração genética conhecida como mutação, ocorre continuamente e ao acaso em uma frequência baixa, talvez uma mutação em qualquer caráter ou traço específico por milhões de gerações celulares. Por exemplo, para o **M. leprae** ou **M. tuberculosis** seria esperado ocorrer ao acaso um mutante resistente a qualquer antibiótico individual em cada milhão de organismos.

Como a mutação acontece? A fim de mudar o caráter biológico ou mais precisamente um "produto gênico", uma proteína deve mudar no mínimo um aminoácido. A maneira mais simples de acontecer isso é conhecida como uma mutação ponto ou "erro de impressão" na qual uma das três bases de ácido nucleico no codon triplo original é simplesmente quimicamente mudada ou substituída por outra, de tal forma que no dicionário do código genético um aminoácido diferente é inserido naquele ponto na proteína. Contudo, se se insere uma base extra em uma posição particular do DNA, altera-se não somente o código triplo para um aminoácido particular por uma única base, mas mudam-se todas as letras no código seguindo-se aquela inserção formando um conjunto inteiramente novo de codons triplos. Isto é chamado uma "mudança de estrutura" ("frame shift"). As consequências são que não há somente um único aminoácido mudado no sítio de inserção, mas todo o codon subsequente é completamente diferente. Desta maneira, pela inserção de uma única base, o código genético é dramaticamente alterado para aquela proteína. Isto permite a produção de seqüências completamente diferentes de aminoácidos em grandes polipeptídeos.

As consequências do processo de

ele produz modificações sutis de proteínas como resultado de mutações ponto por aminoácidos isolados, ele permite a produção de proteínas inteiramente novas pelo mecanismo de inserção ou supressivo de mutagênese. E obvio que a grande maioria de tais mutações que ocorrem são deletérias. Uma "mudança de estrutura" ("frame shift") que altera todos os aminoácidos em uma cadeia polipeptídica após a inserção de uma base, geralmente produz uma proteína que não pode realizar sua função biológica útil e tais proteínas alteradas são frequentemente em geral, rapidamente degradadas. Devido ao fato de muitas destas alterações ocorrerem em moléculas vitais para as células, as mutações em proteínas essenciais muito frequentemente fazem com que as células não possam sobreviver. Essencialmente a única circunstância em que as mutações são capazes de persistir é aquela em que uma mudança é produzida em uma proteína particular, que é selecionada pelo meio para permitir uma sobrevivência maior ou um maior crescimento daquela célula ou organismo do que a matriz da qual ela originalmente se derivou. Esta é a base darwiniana fundamental da hereditariedade. A seleção natural atua sobre produtos de determinados genes dentro dos indivíduos, e aqueles com alguma vantagem são selecionados.

Como nós identificamos genes, isto é, seqüências de bases no DNA que codificam uma proteína ou função particular? Nas bactérias, muitas vezes, o primeiro passo é criar e selecionar uma mutação que altera uma dada função controlada pelo gene em que nós estamos interessados. Por exemplo, se nós desejamos estudar a síntese de ácidos nucleicos e nós admitimos que são necessárias múltiplas enzimas para formar cada uma das bases de ácidos nucleicos, nós podemos procurar mutantes que sejam incapazes de crescer em meio ordinário mas sejam capazes em meio suplementado com uma base particular, tal como "U", requerida para a síntese do RNA. Na ausência de RNA as células são incapazes de formar proteínas e na ausência de proteínas elas são incapazes de replicar e formar DNA. Desta maneira nós podemos procurar uma mutante que não consiga crescer em meio regular porque a

enzima "C" é mutante, mas crescerá em meio suplementado com uracil. Um organismo que tem uma mutação que inibe o seu crescimento mas que pode se desenvolver pela adição de alguma substância química ao meio é chamado de "auxotrófico". Hoje os biólogos moleculares obtêm fragmentos de DNA da cepa mãe original (chamada "tipo selvagem") da qual a mutante foi derivada e que contenham o gene correto para produzir U. Eles, então, adicionam esses fragmentos de DNA à mutante. Para transferir efetivamente DNA entre organismos eles necessitam de um vetor, uma forma de DNA que pode tanto transferir DNA entre as células como também replicar na célula mutante. Se qualquer dos fragmentos inseridos no vetor contiver um gene intacto que transporta a função do gene mutante "C", os organismos agora crescerão em meio mínimo sem adição de uracil. Nós diríamos que o defeito é "complementado" e as células agora complementam sua via de síntese. E por esse procedimento simples de produzir mutações e, então, identificar sequências de DNA que as completem que muito da genética molecular de organismos simples tais como a **Escherichia coli** tem sido descrito. Como será visto mais tarde nós esperamos usar esse conceito de complementação genética para planejar uma estratégia para permitir o cultivo do **M.leprae em tubo** de ensaio.

Revolução além da evolução

O DNA é uma molécula que se auto-replica e, por isso, a biologia molecular permite aos cientistas fazer coisas que não são possíveis na natureza. Por exemplo, enquanto o **M.leprae** não cresce em cultura, o DNA do **M.leprae** pode ser produzido em quantidades infinitas. Se o DNA do **M.leprae** por exemplo, é colocado em um vetor adequado é possível introduzir o vetor na **E. coli** e ver replicar no seu hospedeiro vicário milhões de cópias do DNA original do **M.leprae** cada um deles com a idêntica sequência de ácido nucleico dado pela fita original de DNA. Este é o processo de "clonagem" e as manipulações que permitem que isso seja realizado são comumente conhecidas como "engenharia genética". A revolução biológica molecular

torna possível criar em uma semana, novas moléculas, que levariam milênios para serem produzidas durante a evolução, que têm propriedades e atividades que excedem qualquer uma daquelas que evoluiriam naturalmente. Se alguém, de uma maneira estável, introduz um gene de forma correta que o permita replicar, proteínas estranhas podem ser "expressadas" na célula hospedeira. O DNA estranho é então "recombinado" com o DNA da célula hospedeira representando isto a base da tecnologia do "DNA recombinante".

Manipulando micobactérias

Um dos objetivos de nosso trabalho é transformar o BCG em um veículo multivacinal, capaz de imunizar um indivíduo contra vários antígenos de diferentes patógenos simultaneamente. Para fazer isto nós precisamos desenvolver um BCG recombinante e introduzir e expressar genes, isto é, realizar a transcrição, tradução e síntese de proteínas para antígenos estranhos no BCG. Por isso são necessários vetores que tenham, no mínimo, três requisitos para permitir sua própria sobrevivência e a expressão de um gene estranho. Há basicamente dois tipos de vetores que são usados para intercambiar DNA entre as células. Uma forma é o DNA de vírus que infectam bactérias, denominados fagos. Enquanto todos os fagos podem introduzir DNA nas bactérias por infecção, a maioria se desenvolve e lisa as bactérias hospedeiras liberando muitos milhares de partículas de fagos. De particular interesse para nossos propósitos é um tipo de fago chamado "temperado" que não lisa a célula mas se integra no cromossoma da célula hospedeira e se divide quando a célula se divide. O vetor mais comumente usado consiste geralmente de porções circulares de DNA chamados plasmídios que se replicam no citoplasma.

Além da condição de que o vetor não mate as células hospedeiras há basicamente três requisitos para um vetor ser útil aos nossos propósitos. Primeiro os vetores precisam ser capazes de se replicar em micobactérias e, dessa maneira, eles necessitam um segmento de DNA que funciona como um "replicon" ou origem de replicação.

Segundo, eles precisam naturalmente transportar o gene do antígeno que nós desejamos expressar. E, terceiro, eles necessitam de um "marcador selecionável". A introdução e expressão do DNA estranho por um vetor de uma maneira estável é conhecida como o "processo de transformação da genética". Na maioria das bactérias este é um processo relativamente ineficiente, tanto que requer movimentação de grandes moléculas de DNA altamente carregadas através da parede e da membrana celular tendo de sobreviver à exposição das nucleases, enzimas que degradam ácidos nucleicos como o DNA e RNA. Somente um em mil até um em dez mil bacilos realmente captam DNA plasmidial estranho sob condições normais. Para se obter precisamente aqueles organismos que captaram o DNA estranho e podem, desta forma, expressar o antígeno estranho, necessita-se de "uma seleção genética" que permitirá que somente "transformantes" sobrevivam e matará ou permitirá que morram todos os outros organismos que não captaram o DNA apropriado. O procedimento usual pelo qual isso é realizado em genética bacteriana é introduzir um "marcador genético estável" no DNA introduzido. Para um trabalho experimental este marcador é frequentemente um gene que fornece resistência a um antibiótico particular que, normalmente, destroem as espécies de organismos que estão sendo estudadas. Desta forma, para transformar **E.coli** frequentemente se introduz um pedaço circular de DNA denominado plasmídeo contendo uma origem de replicação, o gene de interesse e um gene com marcador selecionável para resistência a um antibiótico, digamos um gene que codifica a resistência à Kanamicina. Se somente uma célula em um milhão é capaz de captar este DNA nós temos, contudo, condições para permitir que esse organismo se desenvolva selecionando-o em meio contendo Kanamicina. Como a Kanamicina matará todos os organismos que não expressam aquele gene, nós podemos basicamente seccionar para desenvolvimento um organismo em um milhão. Se aquele plasmídeo que está sendo selecionado também contém o gene para um antígeno estranho estão nós estaremos, simultaneamente, selecionando o gene desse

antígeno quando nós selecionamos pela sobrevivência organismos contendo o marcador genético de seleção ou gene de resistência ao antibiótico.

Uma estratégia de Intercâmbio ("shuttle" strategy)

Como as micobactérias, tais como o BCG, crescem de uma maneira extraordinariamente lenta em culturas (por exemplo uma colônia de **E.coli** pode ser vista em uma placa em 8 horas, mas uma colônia de BCG de tamanho equivalente requererá 24 dias), Bill Jacobs idealizou em nosso laboratório a estratégia chave para manipular o DNA em um hospedeiro vicário com o qual é fácil trabalhar como a **E.coli**, inserindo-o depois de volta nas micobactérias. Inicialmente houve problemas formidáveis na introdução de qualquer DNA estranho nas micobactérias devido às paredes celulares contendo lipídios muito refratárias. A primeira brecha foi feita por Jacobs que concluiu que o único agente que se sabia com certeza poder introduzir DNA em micobactérias eram os "micobacteriófagos". Os fagos são virus de bacilos de tuberculose e outras espécies de micobactérias isoladas de material clínico. Ele criou um novo vetor denominado um "shuttle plasmid" que é um micobacteriófago que transporta dentro do seu DNA um plasmídeo capaz de replicar e desenvolver-se na **E.coli**. Dessa forma seu primeiro vetor era capaz de se desenvolver como plasmídeo na **E.coli**, onde os genes podiam ser inseridos e manipulados e depois proliferar nas micobactérias como um fago. Com esses plasmídios, Jacobs introduziu genes estranhos, pela primeira vez, nas micobactérias incluindo o BCG. Uma das importantes consequências desta estratégia era que ele era capaz de identificar o primeiro marcador genético de seleção útil para as micobactérias, a saber, um gene codificando a resistência à Kanamicina.

Como muitos plasmídios podem se replicar muito mais nas bactérias do que em fagos temperados e desta maneira, produzir mais proteínas recombinantes, Scott Snapper e Bill Jacobs em colaboração com T. Kieser, A. Jekkel e colegas em Norwich criaram um

plasmídeo intercambiante que tem a capacidade para intercambiar DNA entre a **E.coli** e as micobactérias e demonstraram que isso funcionava. Sua dedução baseava-se no fato de ter sido relatado previamente que o **M.fortuitum** contém um plasmídeo natural chamado PAL 5000 e embora não se soubesse que ele tivesse qualquer função ou marcadores selecionáveis, somente a existência de um plasmídeo associado com as espécies de **M.fortuitum** indicava que seja o que fosse que faltasse, o plasmídeo deveria ter a capacidade de se replicarem micobactérias, isto é, possuir um replicon. Conseqüentemente foi criado um plasmídeo híbrido no qual um plasmídeo de **E.coli**, com todos os apropriados marcadores selecionáveis de resistência a antibióticos bem como um replicon de **E.coli** foi geneticamente engendrado no plasmídeo do **M. fortuitum** para criar um plasmídeo híbrido que tem uma origem micobacteriana de replicação, bem como marcadores selecionáveis para antibiótico. Esse plasmídeo foi usado com sucesso para transformar o **M.smegmatis** com relação à Kanamicina. Desta maneira, todas as manipulações genéticas, introdução de marcadores selecionáveis, clonagem de genes de antígenos estranhos, crescimento em grandes quantidades podem ser feitos prontamente com **E.coli**. Eles dramaticamente melhoraram a frequência de transformações, isto é, o número de organismos expressando genes estranhos através de uma nova técnica chamada de "eletroporação", na qual o DNA altamente carregado e a superfície celular são expostas a potenciais elétricos muito altos por períodos de tempo muito curtos. Aparentemente um dano é causado 'a membrana pelo potencial elétrico e devido à sua carga o DNA é forçado para dentro da célula. Os plasmídios intercambiante que eles construíram têm replicons tanto para a **E.coli** como para micobactérias, bem como marcadores selecionáveis de resistência a antibiótico que permitem a seleção do vetor plasmidial intercambiante tanto na **E. coli** como nas micobactérias. É particularmente gratificante que o Dr. L. Lugosi trabalhando em nosso laboratório e um dos maiores peritos do mundo em BCG, foi capaz de introduzir DNA estranho nesses plasmídios

intercambiante e selecionar transformantes expressando genes estranhos tanto na **E.coli** como nas micobactérias incluindo subcepas da vacina BCG.

Visualizando bancos

Se nós quisermos construir um veículo multivacinal com o BCG, como vamos obter os genes para antígenos protetores, por exemplo do **M.leprae**, para inserir nos vetores intercambiante? A estratégia que tem sido mais útil a esse respeito foi desenvolvida por Richard Young e Ron Davis utilizando um bacteriófago especial da **E.coli** chamado lambda g-II. O intuito era fazer um banco de toda informação genética do cromossoma do **M.leprae** ou **M.tuberculosis** em um simples vírus bacteriano que infecta a **E.coli**. Para fazer um banco genético, em essência, o DNA da micobactéria ou de qualquer microorganismo é quebrado em muitos pequenos pedaços e cada pedaço é inserido no DNA de um bacteriófago separado. Todos os genes do microorganismo são então divididos e representados por um milhão de bacteriófagos. Desde que o lambda g-II infecta e se desenvolve na **E.coli**, literalmente bilhões de cópias de qualquer bacteriófago podem ser desenvolvidas em uma noite, se nós desejarmos. Os fagos são construídos de tal maneira que os genes estranhos são inseridos no meio do gene que codifica uma enzima da **E.coli**, a beta-galactosidase para transformar um substrato particular em um produto de cor azul quando o DNA estranho está presente. Isto permite facilmente selecionar aquelas **E.coli** infectadas contendo DNA micobacteriano, desde que elas sejam brancas. Quando esses bacteriófagos são usados para infectar **E.coli** eles produzem muitas e muitas cópias deles mesmo e no processo matam e lisam suas **E.coli** hospedeiras formando "placas". Mas cada placa conterá um pequeno número de proteínas micobacterianas codificadas por um simples pedaço de DNA micobacteriano. Usando anticorpos então para detectar antígenos do **M.leprae** foi possível para R.Young identificar placas individuais que contém

bacteriófagos com o gene para um único antígeno do **M.leprae**.

Desta maneira, seis ou sete antígenos principais do **M.leprae** e **M.tuberculosis** foram identificados em bancos de lambda gtlI recombinante e os genes para muitos daqueles antígenos foram obtidos e identificados. Uma vez obtida a sequência de DNA codificando o DNA micobacteriano inserido é possível usando o código genético, prever a sequência de aminoácidos da proteína. Desta maneira é possível imaginar a sequência de aminoácidos de um antígeno mesmo se houver proteína insuficiente para determinar a sua sequência de aminoácidos. Um dos achados notáveis dos genes do antígeno micobacteriano, uma vez que sua sequência de DNA tenha sido determinada, é que quase a metade dos principais antígenos tem predito sequências de aminoácidos muito semelhantes a uma classe conhecida de proteínas encontradas em todos os organismos vivos conhecidas como proteínas do choque pelo calor ou proteínas de stress. Essas são proteínas que são rapidamente produzidas quando os organismos são estressados ao serem submetidos ao calor ou serem privados de nutrientes ou serem expostos a moléculas tóxicas, tais como o poróxido de hidrogênio. Suas funções precisas são desconhecidas, parece que elas estão criticamente envolvidas no dobramento apropriado de proteínas e no transporte de proteínas através de membranas. Uma interpretação é que as bactérias que se encontram no hospedeiro animal estão estressadas e produzem antígenos diferentes dos que elas produziram em cultura. Uma séria implicação deste resultado é que as proteínas do choque pelo calor são altamente conservadas, isto é, semelhante em estrutura através da evolução.

Desta maneira sabemos que a proteína do choque pelo calor 65 do **M.leprae** tem cerca de 50% dos seus aminoácidos idênticos àqueles da **E.coli** mas também àquelas da proteína do choque pelo calor 65 dos seres humanos. Assim há uma clara similaridade antigênica entre certas proteínas micobacterianas e suas equivalentes nos seres humanos. Isto sugeriu um modelo "hit-and-run" para certas doenças autoimunes, por exemplo a artrite reumatóide e possivelmente outras doenças

auto-imunes. Um indivíduo é infectado por uma micobactéria e monta uma resposta entre outros antígenos contra as proteínas do choque pelo calor. Algumas das células T produzidas contra os antígenos bacterianos então reagem cruzadamente contra a proteína do choque pelo calor equivalente humana encontrada em quantidade aumentadas no tecido inflamado. Mesmo após matar a bactéria o sistema é capaz de manter uma resposta auto-imune crônica. É uma hipótese intrigante que está sendo hoje ativamente investigada. Isto também significa que os antígenos candidatos a vacinas protetoras precisam ser examinados criticamente com relação a sua capacidade de gerar auto-reatividade.

Uma vez identificados os antígenos protetores recombinantes é, então, uma tarefa relativamente fácil retirar o fragmento do DNA micobacteriano, que codifica o gene do antígeno do **M.leprae**, do vetor de expressão lambda gtlI e transferi-lo para um plasmídeo transportador que pode ser usado para transformar micobactérias e, desta maneira, expressar o antígeno do **M.leprae** no BCG.

Embora a biologia molecular seja uma disciplina vasta e sempre em expansão eu tentei aqui esboçar alguns dos princípios básicos da biologia molecular que, acredito, tenha relevância para introduzir genes estranhos e antígenos de expressão no BCG. Nós esperamos que isso levará ao desenvolvimento de novos tipos de vacinas multivalentes que serão efetivas na prevenção da hanseníase, da tuberculose e de outras doenças infecciosas também.

Olhando o futuro

Quais as esperanças que a biologia molecular traz em relação às micobactérias no futuro? Deixe-me considerar umas poucas possibilidades ou talvez fantasias:

Desenvolvimento do BCG como um veículo multivacinal. Nossa esperança, há longo tempo, tem sido ser capaz de usar o BCG como veículo para introduzir e expressar genes para antígenos protetores de vários patógenos, capaz de fornecer uma imunização única

contra múltiplas doenças infecciosas, As vantagens potenciais do BCG como um veículo multivacinal são bem conhecidas: a) tem sido usada em cerca de um bilhão de pessoas com uma incidência muito baixa de efeitos colaterais graves; b) é uma de somente duas vacinas que pode ser administrada no nascimento; c) é geralmente dada como uma vacina em uma única dose e a sensibilização aos antígenos micobacterianos pode persistir por 5 a 50 anos; d) é o melhor adjuvante para uso em seres humanos; e) é barata custando somente US\$ 0,055 por dose de vacina, Contudo, muito mais precisa ser conhecido em nível molecular para se conseguir uma expressão estável, de alto nível, de antígenos estranhos no BCG. Com o desenvolvimento de marcadores selecionáveis que não envolvem antibióticos e níveis razoavelmente altos de transformação genética, seria possível nos próximos anos testar a possibilidade de imunizar com diferentes antígenos protetores, contra numerosos patógenos expressos em BCG recombinante em sistemas experimentais. Minha impressão é que é improvável que o fator limitante seja a biologia molecular, mas sim, a imunologia particularmente na identificação de quais os antígenos são protetores.

Estratégia genética para crescimento do **M. leprae**. O fato de que o **M. leprae** se multiplica em macrófagos humanos e células de Schwann "in vitro" sugere que o **M. leprae** pode ter acumulado mutações e supressões, em numerosos genes importantes, necessários para a sua sobrevivência. Jacobs formulou uma estratégia para construir bancos de DNA contendo todos os genes de uma micobactéria, tal como o **M. smegmatis** que cresce rapidamente, em nossos plasmídios transportadores. Nós, então, tentaríamos transformar o **M. leprae** com este banco, contendo todos os genes divididos em milhares de plasmídios. Se um **M. leprae** recebe um plasmídio contendo os genes que codificam enzimas, que produzem os mesmos nutrientes que são fornecidos pelos seus hospedeiros macrófagos, então pode ser possível para aquele **M. leprae** multiplicar-se em cultura livre de células. Se isto pudesse ser conseguido seria muito mais fácil estudar a

biologia, genética, bioquímica e imunologia do **M. leprae**.

É claro que pode ser empregado um meio para conceber, geneticamente, espécies de micobactérias de crescimento lento tais como o **M. tuberculosis** e o BCG para multiplicar-se mais rapidamente em cultura.

Estratégia genética para se projetar novas drogas. Porque o **M. leprae** não cresce em cultura e, porque, é muito incômodo empregar o teste do coxim plantar do camundongo para verificar se as drogas são ou não efetivas em matar os microorganismos, é muito difícil projetar drogas mais potentes para competir com alvos enzimáticos. Nossa esperança seria identificar alvos potenciais para antibióticos como por exemplo, topoisomerase como alvo do ácido nalidíxico e fluorquinolonas, RNA polimerase como alvo para a rifampicina, etc, e então produzir mutações nessas enzimas em uma micobactéria de crescimento rápido, A estratégia seria ,então, complementar aquelas mutações na micobactéria de crescimento rápido transformando-as com bancos de DNA do **M. leprae** e **M. tuberculosis**, Novamente, qualquer plasmídio que contenha o segmento correto do cromossoma do **M. leprae**, que expressa o gene para a enzima alvo, complementar o defeito na mutante de crescimento rápido e permitiria agora que ela se multiplique repetidamente em cultura. Desta maneira, nós teríamos um hospedeiro vicário para testar drogas contra aquela enzima porque esse hospedeiro necessita dessa enzima do **M. leprae** para sobreviver, A atividade bactericida e bacteriostática das drogas e análogos poderia facilmente ser testada, medindo sua capacidade em inibir o crescimento ou em matar o hospedeiro micobacteriano recombinante que cresce rapidamente.

Estratégia para identificar novos antígenos protetores de qualquer patógeno que mate camundongos. Se altos níveis de expressão de antígenos estranhos pudessem ser conseguidos no BCG e, se o BCG recombinante fosse realmente um imunógeno e uma vacina muito efetiva, poderia ser possível imunizar o camundongo com uma mistura de células de BCG recombinante das quais somente umas poucas, expressam o antígeno prote-

tor do patógeno a ser testado, A estratégia novamente seria preparar bancos genéticos de DNA em plasmídios transportadores capazes de expressar todos os genes de um patógeno como, por exemplo, a malária murina ou o **M.tuberculosis** no BCG, Os plasmídios seriam transformados no BCG produzindo BCG recombinante, do qual cada célula expressa umas poucas proteínas do patógeno, mas o banco total ou agregado representa todas as proteínas do patógeno estranho, Esse BCG transformado, expressando todos os antígenos do patógeno, seria usado para imunizar camundongos e, então, os camundongos seriam expostos a uma infecção letal por um dado parasita, Os únicos camundongos que sobreviveriam ao estímulo letal seriam aqueles que foram imunizados pelo BCG recombinante contra antígenos protetores importantes, O BCG recombinante seria isolado daqueles sobreviventes e, aquele plasmídio transportador particular, contendo o gene que codifica o antígeno protetor, seria recuperado e caracterizado molecularmente. A beleza dessa estratégia é que os genes para o antígeno protetor seriam clonados mesmo antes que a natureza do antígeno fosse conhecida,

Testes diagnósticos novos e rápidos para a hanseníase e tuberculose. Já tem sido possível identificar sequências únicas de DNA no **M. leprae** e **M. tuberculosis** que são encontradas somente nessas espécies. Moléculas de DNA complementares que se ligam exclusivamente a esses segmentos homólogos específicos, estão, atualmente sendo desenvolvidos usando a tecnologia do DNA recombinante, Com tais sondas é possível desenvolver testes onde é usado uma pequena sonda de DNA específica para uma sequência de DNA exclusiva do **M.leprae** ou, para uma sequência de DNA diferente e única para o **M.tuberculosis** e não para outra micobactéria, Com a técnica denominada "reação em cadeia da polimerase" (PCR) nós podemos "amplificar", isto é, produzir milhões de cópias de uma sequência de DNA isolada de uma única célula em um nível que pode ser visualizada ou contada com técnicas de marcação pela radioatividade. Desta maneira, se nós tivermos uma sonda específica de DNA para o **M.tuberculosis** seria

possível ligá-la a Cima amostra de DNA de um número muito pequeno de organismos em uma porção de escarro, por exemplo, e talvez mesmo se houver somente um organismo. Se ela encontrar o seu homólogo ela pode ser amplificada várias milhões de vezes e daria um sinal positivo, indicando que o **M.tuberculosis** estava presente na amostra, Se o **M.tuberculosis** não estivesse presente na amostra de escarro, a sonda específica não teria a sequência complementar de DNA para se ligar e, dessa forma, quando fosse tentada a amplificação com o PCR, nenhum sinal seria produzido ou ampliado. Desta maneira seria possível, em poucas horas, saber se mesmo pequenos números de **M.tuberculosis** ou **M. leprae** estão presentes em uma amostra clínica. No caso de tuberculose, nós prevemos que isso evitará a necessidade de culturas de escarro por longos períodos para positivamente identificar o patógeno, Seria possível também saber através de pequenas biópsias de lesões se sequências únicas de DNA, encontradas somente no **M.leprae**, estão presentes e fazer um diagnóstico de hanseníase mais precoce e mais seguro, A reação PCR e outras técnicas de amplificação de sondas de DNA estão perto de revolucionar o diagnóstico de muitas doenças infecciosas e, com toda certeza, incluindo a tuberculose e a hanseníase. Sua principal desvantagem atualmente é primariamente o fato de que a metodologia usa radio-isótopos que é, hoje, relativamente caro para ser realizada no campo.

Este ensaio procurou compartilhar minha excitação pelos progressos da biologia molecular e salientar sua força e potencial para desenvolver novas estratégias para combater velhas doenças infecciosas. Há muitos obstáculos a serem enfrentados, muitos problemas técnicos e conceituais a serem apontados e muitas frustrações e fracassos a serem suportados, Contudo, é somente produzindo novos instrumentos para experimentar e fazendo novas perguntas que apesar dos fracassos, inevitáveis talvez, algumas novas abordagens trarão contribuições mais significativas para diagnosticar, tratar e, por último, prevenir estes dois antigos flagelos da espécie humana, a hanseníase e a tuberculose.

Agradecimentos: Como o autor não é um biologista molecular, seja qual for o mérito deste artigo, êle reflete os esforços de meus muitos professores, que muito agradeço, Quaisquer erros indicam que todas as lições ainda não foram aprendidas, Tem sido um privilégio trabalhar com Bili Jacobs que essencialmente criou, a genética molecular de micobactérias e tem sido um professor que estimula, um colega e um amigo. Muitas das idéias básicas da biologia molecular e da genética com relação às micobactérias foram transmitidas pelo Dr, Richard Young, no Instituto White Head e pelo Dr, Ronald Davis na Universidade de Stanford. Uma quantidade inestimável de conhecimentos veio de meus alunos, que questionaram cada passo, me forçaram a aprender para manter-me ao lado deles, em particular Scott Snapper, Halpana Ganjam, Lisa Pane e Raul Barletta. Agradecimentos especiais são devidos ao Dr. Laszlo

Lugosi, um dos grandes mestres em micobactérias e BCG, de quem muito se tem aprendido. Muito da motivação para pensar em micobactérias em termos moleculares e muito da minha compreensão acerca da clínica da hanseníase e da tuberculose veio dos meus colegas dos "Steering Committees do IMMLEP, THELEP e IMMTUB da Organização Mundial de Saúde (OMS) e eu estou particularmente em débito com os Drs. Noordeen, Grosset, Ivanyi, Engers e Lambert pela sua ajuda e paciência ilimitadas, O apoio da OMS e dos Institutos Nacionais de Saúde que tornaram este trabalho possível é gratamente reconhecido. Finalmente eu estou honrado e agradecido por ter sido solicitado pelos organizadores do XIII Congresso Internacional de Hanseníase e pelo Dr. Anaiik Rouillon, do IUATLD, para contribuir com este trabalho.