

## TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS

### TUBERCULOSIS: GENERAL ASPECTS AND DEVELOPMENT OF NEW VACCINES

Ga José Gilmar Costa Santos<sup>1\*</sup>; Alan Blendo Bonfim Correia<sup>2</sup>; Renata Costa Santos<sup>3</sup>; Mabel Alencar do Nascimento Rocha<sup>4</sup>; Camilla de Aguiar Dalan<sup>5</sup>; Patrícia Rodrigues Marques de Souza<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Alagoas.

<sup>5</sup>Universidade Federal de Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

<sup>6</sup>Núcleo de Educação em Saúde da Universidade Federal de Sergipe, Campus de Lagarto.

\*Endereço para correspondência: Cláudio Batista, S/N - Palestina, Aracaju - SE, CEP: 49060-108.

Email: [jjgilmanu@hotmail.com](mailto:jjgilmanu@hotmail.com)

### RESUMO

A tuberculose (TB) é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e representa um problema de saúde pública global, sendo considerada uma das doenças transmissíveis mais mortais do mundo. Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada. Atualmente, a forma de prevenção à TB é a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), porém, a mesma apresenta limitações, pois protege apenas as crianças e previne somente as formas graves de TB, além de apresentar proteção variável de 0 a 75%. Isso aponta a necessidade do desenvolvimento de uma vacina mais efetiva para o combate da TB. Dessa forma, esta revisão objetiva apresentar as características gerais da TB e seu agente causador e sobre as vacinas atualmente sendo estudadas como alternativas preventivas para a BCG. Foi realizada uma pesquisa de natureza qualitativa e exploratória, utilizando informações do Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde, dissertações, teses e artigos disponíveis em diferentes bases de dados. Os resultados alcançados revelam que uma das alternativas mais promissoras para o combate da TB é a vacina de DNA-hsp65, constituída por um plasmídeo de DNA contendo o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa de micobactéria (*M. leprae*).

**Palavras-Chave:** infecção; *Mycobacterium tuberculosis*; imunização; vacinas de DNA.

### ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and is a global public health problem and is considered one of the deadliest infectious diseases of the world. It is estimated that about one third of the world population is infected. Currently, the way to prevent TB is BCG (Bacilo Calmette-Guérin) vaccination, however, it has some limitations because it only protects children and just prevents severe forms of TB, besides presenting variable protection of 0-75%. This shows the need to develop a more effective vaccine to fight TB. Thus, this review aimed to present the general characteristics of TB and its causative agent and on the vaccines currently being studied as preventive alternatives for BCG. A qualitative and exploratory research was carried out, using information from the Ministry of Health, World Health Organization, dissertations, thesis, and articles available in different databases. The results show that one of the most promising alternatives for TB control is the DNA-hsp65 vaccine, consisting of a DNA plasmid containing the gene coding for mycobacteria (*M. leprae*) 65 kDa heat shock protein.

**Key Words:** infection; *Mycobacterium tuberculosis*; immunization; DNA vaccines.

### INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) representa um problema de saúde pública global, sendo considerada uma das doenças transmissíveis

mais mortais do mundo (1). Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como emergência mundial. Ainda, estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada. Em

2014, estimativas da OMS mostram que 9,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,5 milhões morreram da doença, o que inclui 400.000 mortes entre as pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immuno deficiency Virus*). Os países que apresentaram maior número de casos incidentes em 2013 foram: Índia, China, Nigéria, Paquistão, Indonésia e África do Sul. Sozinhos, os três países, Índia, Indonésia e China, representaram 23%, 10% e 10% dos casos mundiais, respectivamente (2).

O Brasil ocupa a 15ª posição de uma lista de 22 países em desenvolvimento que são responsáveis por 80% de todos os casos mundiais de TB (3). Além disso, estima-se que ocorram cerca de 129.000 novos casos por ano no país, dos quais aproximadamente 90.000 são notificados (4,5). No Brasil, existem 181 municípios considerados prioritários para o controle da TB. A região sudeste apresenta a maior quantidade de municípios prioritários, seguida da região nordeste. Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro possuem 76,5% dos municípios prioritários da Região Sudeste. No Nordeste, o estado da Bahia possui o maior número de municípios prioritários (6). Em 2013, foram confirmados 91.369 casos de TB no Brasil (7).

Atualmente, a forma de prevenção utilizada para a TB é a vacina BCG (Bacilo Calmétique-Guérin). Esta vacina foi desenvolvida em 1921 pelos pesquisadores Calmétique e Guérin no Instituto Pasteur através da atenuação do *Mycobacterium bovis* (8). No entanto, a BCG apresenta limitações, pois protege apenas as crianças e previne somente as formas graves de TB, além de apresentar proteção variável de 0 a 75% (9,10). Além disso, estudos realizados com a intenção de utilizar uma segunda dose de BCG para conferir proteção à população adulta contra a TB verificaram que essa estratégia não apresenta viabilidade (11,12). Isso aponta a necessidade do desenvolvimento de uma vacina mais efetiva para o combate da TB, que ainda não possui prevenção segura e eficaz (13).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi apresentar uma revisão da literatura sobre características gerais da TB e seu agente etiológico e as vacinas estudadas atualmente como alternativas ao BCG para a prevenção dessa doença.

## ETIOLOGIA, TRANSMISSÃO E FORMAS CLÍNICAS

A TB é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou bacilo de Koch, assim também chamado por ter sido identificado pela primeira vez pelo cientista alemão Robert Koch, em 1882. Trata-se de uma bactéria em forma de bacilo, intracelular facultativo, aeróbio estrito que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar, não encapsulado, não formador de esporos, imóvel e de crescimento lento. O Mtb possui uma parede celular rica em lipídios e ácidos micólicos e se replica a cada 15-20h, o que é extremamente lento em comparação com outras bactérias, como, por exemplo, a *Escherichia coli* (20 minutos) (14). Esse bacilo possui uma dimensão que varia de 3 a 5µm de comprimento e é resistente à descoloração por álcool-ácido devido ao alto teor de lipídios em sua parede celular, formando uma barreira hidrofóbica, quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN). Por isso, o Mtb é também chamado de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) (14-16).

A transmissão da TB acontece de forma direta de um indivíduo para outros através de tosse, fala ou espirro, quando são eliminadas gotículas de saliva contendo o Mtb. Apenas os indivíduos com TB pulmonar ativa são bacilíferos, ou seja, são capazes de transmitir a doença. Após o contato com o bacilo, este pode ser eliminado, desenvolver-se sem causar a doença ou causar a TB. Desnutrição, idade avançada, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) e uso de medicamentos imunossupressores são alguns dos fatores que tornam o indivíduo mais susceptível ao adoecimento por afetarem o sistema imunológico. Além disso, a carga bacilífera e a virulência da bactéria também influenciam no aparecimento da doença em indivíduos imunocompetentes. Geralmente, a TB afeta os pulmões (TB pulmonar), mas outros órgãos e sistemas também podem ser acometidos (TB extrapulmonar), como, por exemplo, ossos, rins, linfonodos e meninges (17,18).

Em 5 a 10% das pessoas infectadas a resposta imunológica é incapaz de proteger o organismo após a primeira infecção tuberculosa e o indivíduo desenvolve a doença em algum momento da vida,

principalmente nos dois primeiros anos após a infecção (19). Nesse caso, a doença é chamada de TB primária ou de primoinfecção e pode evoluir de um foco pulmonar ou ganglionar. Uma das formas mais graves de TB primária é a forma miliar, que é consequência da disseminação hematogênica e apresenta lesões granulomatosas pequenas e difusas, que atingem não apenas os pulmões, mas muitos órgãos, como laringe e rins, por exemplo (14). Uma das formas clínicas com risco de morte elevado é a TB no Sistema Nervoso Central (SNC). O comprometimento do SNC acontece basicamente sob duas formas: meningoencefalite e tuberculoma intracraniano. Com maior incidência em crianças de seis meses a cinco anos de idade e entre os indivíduos com imunodepressão, particularmente os portadores de AIDS, a TB no SNC evolui para óbito em 100% dos casos na ausência de tratamento medicamentoso (20,21) e é responsável por cerca de 3% dos casos de TB em indivíduos imunocompetentes e, em casos de coinfeção com HIV/AIDS, 10% de todos os casos de TB (22,23). Além da pandemia do HIV/AIDS, a resistência aos medicamentos antituberculose, a imunossupressão secundária ao tratamento do câncer, doenças autoimunes e transplantes também constituem fatores de risco para o desenvolvimento da TB no SNC (20). A TB pós-primária ou secundária acontece quando o indivíduo apresenta competência imunológica e consegue deter a infecção inicial, mas a doença desenvolve-se posteriormente a partir de um foco latente (reinfecção endógena) ou através de uma nova infecção (reinfecção exógena), onde o sistema de defesa não é capaz de conter a sua progressão (14,24-27).

## RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Após ultrapassar o trato respiratório superior e chegar aos alvéolos, para se instalar no organismo, o Mtb interage com receptores celulares para iniciar a infecção (17). Assim, a lipoproteína de 19kDa e outros derivados lipídicos interagem com o TLR2 (*Toll-like receptor 2*), que é um receptor de superfície celular dos fagócitos, sendo capaz de ativá-lo. O controle da infecção pelo Mtb também acontece através da interação do bacilo com os receptores TLR4. São

justamente essas interações que induzem uma resposta predominantemente inflamatória verificada na TB (28,29). Os macrófagos fagocitam os bacilos e buscam eliminá-los através do pH ácido, enzimas lesivas pela fusão do lisossoma com o fagossoma e consequente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (27,30,31).

Através da apresentação de antígenos, macrófagos ativados e infectados com Mtb ativam o início da resposta imunológica-específica, desencadeando assim mecanismos de eliminação efetiva do bacilo. Desenvolvem-se a resposta imunológica celular e também a humoral. No entanto, essa resposta humoral pode não ser suficiente para eliminar o bacilo. Isso acontece porque apesar da produção de anticorpos específicos contra antígenos do Mtb, estes não são capazes de penetrar nas células infectadas e destruir o bacilo (17,32).

As células T CD4<sup>+</sup> desempenham a principal função na resposta contra a bactéria (33). Através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), as células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e células dendríticas apresentam antígenos do bacilo às células T CD4<sup>+</sup> no tecido linfóide associado aos brônquios, e também produzem citocinas inflamatórias, tais como as interleucinas (IL): IL-12, IL-6 e IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que são capazes de recrutar neutrófilos e monócitos (24,34). Essas células e citocinas são importantes para a formação do granuloma, que é caracterizado pelo infiltrado de neutrófilos e monócitos, com grande quantidade de Linfócitos T e B que circundam o concentrado de macrófagos e células dendríticas infectados com bacilos (35). Indivíduos com imunossupressão apresentam comprometimento funcional dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o que afeta a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-12, resultando na má formação do granuloma e permitindo, assim, que o bacilo infecte outros órgãos (36).

Nesse contexto, o TNF- $\alpha$  é a citocina primordial no controle e manutenção do granuloma por regular localmente a concentração de quimiocinas para o recrutamento de células, o que impede reativação da TB (29). A IL-12 (produzida pelas APCs) e citocinas produzidas por

linfócitos ativados, como a IL-2, mantêm a ativação e proliferação de linfócitos, induzindo a resposta celular predominantemente pró-inflamatória (Th1 – *T helper1*). IL-12 aumenta a produção de IFN- $\gamma$  em células NK (natural killer) e a expansão de Th1 específicas a antígenos da micobactéria. Também produzido pelas células Th1, o acúmulo de IFN- $\gamma$  no pulmão é responsável pela parada do crescimento bacteriano (36). Trata-se de uma citocina ativadora de macrófagos, tornando o mesmo capaz de produzir óxido nítrico e outros radicais intermediários do nitrogênio, que são bactericidas e importantes no combate ao Mtb (37). Além disso, outras citocinas como IL-23, IL-18 e IL-27 também induzem a produção de IFN- $\gamma$  (33). A produção de IL-23 é essencial para a secreção de IL-17 (Th17), que é um potente indutor de expressão de quimiocinas, as quais irão promover a migração de leucócitos do sangue para o local da inflamação (38).

Outro mecanismo fundamental para o combate ao bacilo é a apresentação cruzada, onde antígenos micobacterianos são secretados em vesículas apoptóticas, associadas ao MHC de classe I, e assim ativam células T CD8<sup>+</sup>. Quando ativadas, essas células produzem IFN- $\gamma$  e liberam grânulos enzimáticos ricos em granulinsina, que ativam outras enzimas capazes de degradar lipídios e causar a lise celular por apoptose (39). Na TB avançada, frequentemente são encontrados marcadores da resposta Th2, como IL-4, imunoglobulina (Ig) E e IgG4, mas ainda são necessários estudos para avaliar o seu papel real na progressão da doença (40). Ainda, existe na TB a atuação de células T reguladoras (Treg), que regulam a resposta imunológica do hospedeiro contra o Mtb através da produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), com efeito supressor sobre a imunidade celular. Essas células podem limitar a resposta imunológica eficaz, diminuindo o dano tecidual inflamatório, mas com conseqüente inibição da resposta Th1 impedindo o controle adequado da infecção (25,31,41,42). Além disso, o Mtb apresenta diversos mecanismos de escape da resposta imunológica, que incluem a inativação de enzimas lisossomais, inibição da fusão entre lisossoma e fagossoma, o que impede que a bactéria tenha contato com o ambiente hostil

do lisossoma, como pH ácido e enzimas lesivas (30). Dessa forma, percebe-se a complexidade da resposta imunológica desenvolvida para combater o Mtb. No entanto, essa resposta pode não ser eficaz e permitir a disseminação do bacilo a partir de um foco pulmonar para outros órgãos.

## SINTOMAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Inicialmente, alguns doentes podem não apresentar sintomas específicos de TB. Os sintomas da TB pulmonar incluem tosse por mais de três semanas, com ou sem secreção, dor torácica, falta de apetite, perda de peso, fraqueza, falta de ar e cansaço, calafrios, febre e sudorese noturna. A sintomatologia da doença em outras partes do corpo depende da área afetada. Além de não transmitirem a doença a outras pessoas, indivíduos com TB latente são assintomáticos (43).

O diagnóstico de um doente com TB é de extrema importância, particularmente em um bacilífero, pois possibilita seu tratamento e cura, eliminando uma fonte de infecção. A suspeita clínica da doença inicia a partir da manifestação de sintomas. A confirmação diagnóstica é dada pela identificação do Mtb em material biológico através da baciloscopia, da cultura ou de métodos moleculares (14,44). A pesquisa do bacilo é realizada em amostras de escarro, lavado brônquico, lavado broncoalveolar e outras relacionadas ao trato respiratório. Outros exames podem auxiliar o médico no diagnóstico da doença, como hemograma, bioquímicos e radiológicos (45).

O tratamento da TB é realizado através de quimioterapia, sendo utilizados diferentes antibióticos e com duração mínima de seis meses. Isso contribui para o alto número de casos de abandono do tratamento. Quatro fármacos principais são considerados de primeira linha no tratamento da TB: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. São drogas com importante atividade bactericida, pois apresentam a capacidade de reduzir rapidamente o número de bacilos viáveis e tornar os pacientes não infectantes. Pelo menor grau de eficácia e maior possibilidade de toxicidade, seis classes de fármacos de segunda linha (aminoglicosídeos injetáveis, estreptomina, canamicina e amicacina; o polipeptídeo

injetável capreomicina; os agentes orais etionamida, ciclosserida e ácido paraaminossalicílico – PAS; e os antibióticos da fluorquinolona) costumam ser apenas usadas no tratamento de pacientes com TB resistente aos fármacos de primeira linha (46). Existe ainda uma grande preocupação quanto à eficácia desses medicamentos contra a doença pelo aumento da quantidade de indivíduos portadores de cepas multi-drogas resistentes (47). Pode ocorrer a resistência a uma droga (monorresistência) ou a duas drogas, exceto a combinação de rifampicina e isoniazida (polirresistência). A multirresistência (MDR) consiste na resistência para pelo menos as drogas rifampicina e isoniazida, enquanto que a super-resistência (XDR) ocorre quando existe MDR associada à resistência a pelo menos uma das seguintes drogas injetáveis: amicacina, canamicina ou capreomicina, e a uma fluorquinolona (22).

## VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE

A vacinação é um processo que consiste em induzir a resposta de forma rápida e específica do sistema imunológico do indivíduo contra algum microorganismo ou elemento por ele produzido. Atualmente, o aumento do conhecimento na área da imunologia tem contribuído para o desenvolvimento de novas vacinas, buscando a estimulação de uma resposta imunológica específica, protetora e de longa duração. Para tanto, procura-se identificar o alvo para o qual se deseja induzir uma resposta imunológica, como, por exemplo, um patógeno ou uma toxina, em seguida, investiga-se quais os elementos dessa resposta que são importantes para eliminar o alvo e desenvolver as estratégias necessárias para combater esse alvo (48).

Introduzidas a partir do século XX, as vacinas de primeira geração são constituídas por microorganismos vivos e atenuados, como a BCG, usada contra a TB, ou mortos e inativados, como a vacina contra a *Bordetella pertussis*. A profilaxia da TB através da imunização com BCG ainda consiste na melhor alternativa para a proteção dos indivíduos contra a doença, pois protege contra as formas mais graves de TB durante a infância, TB extrapulmonar e meningite tuberculosa, e também contra a hanseníase (49). O desenvolvimento da BCG

foi iniciado em 1921 e acreditava-se que esta vacina controlaria e até mesmo erradicaria a TB (50). Mesmo sendo amplamente utilizada, esta vacina é ineficaz em algumas populações e interfere no teste de hipersensibilidade cutânea (PPD), usado para diagnóstico de TB e para fins epidemiológicos (51,52). Esta vacina foi originalmente obtida de um isolado de *Mycobacterium bovis*, atenuado através de diversas séries de passagens por meio de cultura durante 13 anos (1908 – 1921). Uma possível explicação para a variabilidade da eficácia desta vacina é a diversidade de cepas do BCG. Depois de anos de crescimento e repiques em diversos laboratórios, várias cepas da vacina foram geradas através de deleções, duplicações ou mudanças no número de sequências gênicas de uma região conhecida como RD1 (49). Além de reversão da virulência, existe grande preocupação também quanto à segurança da BCG pela possibilidade de indução da patologia em indivíduos imunocomprometidos (53), principalmente quando considera-se que, no caso da TB, a co-infecção pelo HIV tem se tornado cada vez mais comum. Assim, existe a necessidade de uma alternativa de imunização mais segura e eficaz para combater a TB, o que tem levado muitos pesquisadores a buscarem o desenvolvimento de novas vacinas (48).

O desenvolvimento de vacinas evoluiu muito com a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como a otimização das vias de administração e apresentação desses antígenos às células do sistema imunológico. Isso permitiu o desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes. Consideradas de segunda geração, as vacinas de subunidades são constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes (48). Elas consistem no uso de um ou mais componentes da micobactéria, como elementos da parede do bacilo ou moléculas secretadas, como proteínas, carboidratos, lipoglicoproteínas e glicolipídeos (54). São consideradas seguras, mas exigem alto custo de produção e também se mostram pouco imunogênicas (55). Um exemplo de vacina de subunidade é a Mtb72F, que é uma proteína obtida através da fusão dos antígenos Mtb39 e Mtb32. Ela já foi estudada

como vacina de subunidade (56) e na estratégia de *prime-boost* como o reforço para a vacina de BCG (57) apresentando resultados promissores. Outra proteína de fusão baseada nos antígenos Ag85B e ESAT6 também é alvo de estudos (58).

Recentemente, surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde os genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos potencialmente imunogênicos são carregados por DNA plasmideal. A vacina de DNA é uma ferramenta para o combate de doenças infecciosas que ainda não possuem prevenção segura e eficaz (por exemplo: herpes, malária, AIDS e TB) (13).

Uma grande quantidade de antígenos tem sido estudada sob a forma de vacina de DNA. As vacinas gênicas que codificam proteínas da família de Ag85 (59), ESAT-6, hsp70, proteína de 36kDa e MPT83 (60), Pho S (61), PLCa (62) e HSP65 (63) ou uma combinação das mesmas têm sido alvo de muitas investigações. O Antígeno 85 (Ag85) e a proteína de choque térmico de 65kDa (hsp65) foram os antígenos mais estudados (48,63,64). Os plasmídeos usados apresentam sequências de DNA necessárias para seleção e replicação em bactérias, promotores especiais para processos de transcrição e tradução, genes que conferem resistência a antibióticos para a seleção das bactérias transformadas e, sequências específicas que permitem a expressão gênica em células eucarióticas e procarióticas (65). Quando o DNA é administrado, o organismo passa a produzir o antígeno por meios próprios, sem os efeitos indesejáveis da introdução de um agente infeccioso patogênico ou de vacinas contendo subunidades protéicas e adjuvantes (66). Assim, o gene inserido no plasmídeo codifica a proteína imunogênica nas células do indivíduo e ativa a sua memória imunológica (48,67). Ainda, as vacinas de DNA mimetizam os efeitos das vacinas vivas por possibilitarem a geração de antígenos endógenos e, conseqüentemente, a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Outra possibilidade de otimização desse tipo de vacina é a sua utilização em associação com adjuvantes como as sequências de nucleotídeos CpGs (citosina-fosfato-guanina) não metilados. Os CpGs têm capacidade imunoestimulatória ativando receptores TLR9 e TLR3, dando início à resposta imunológica

inata, com um direcionamento para uma padrão Th1 (68).

Essas vacinas são capazes de modular a imunidade celular e humoral, estimulando linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Após a introdução do DNA plasmideal na célula do indivíduo, ocorre a produção da proteína de interesse. A proteína sintetizada é clivada pelo proteossoma e gera peptídeos, os quais se associam às moléculas do MHC de classe I e ativam as células T CD8<sup>+</sup>. Já as proteínas produzidas e liberadas pelas células são fagocitadas pelos macrófagos e clivadas, gerando peptídeos que são apresentados pelas moléculas do MHC de classe II e ativam os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Dessa forma, esse padrão de ativação da resposta gera memória imunológica permanente em indivíduos que recebem a vacina de DNA (69).

### **VACINA DE DNA-hsp65 NO COMBATE DA TUBERCULOSE**

Desenvolvida pelo pesquisador Dr. Célio Lopes Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), uma das estratégias de imunização estudadas para o combate da TB é a vacina de DNA-hsp65. Trata-se de uma vacina gênica constituída por um plasmídeo de DNA contendo o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65kDa (HSP65) de micobactéria (*Mycobacterium leprae*) (13,64,69,70). Tem sido demonstrado que a proteína HSP65 sozinha é capaz de induzir proteção contra o desafio com cepa virulenta de Mtb em modelo experimental murino (70). Esta proteína pertence ao grupo das proteínas de choque térmico, que se caracterizam por serem altamente conservadas. Proteínas homólogas foram encontradas em uma grande variedade de procariotos e eucariotos, funcionando como chaperonas na conformação pós-traducional de proteínas. Os genes hsp65 de Mtb e *M. bovis* (BCG) são idênticos e têm uma identidade de 90% com o gene de *M. leprae*. A proteína HSP65 é um dos antígenos encontrados no filtrado de cultura de Mtb e é produzida em grande quantidade pelo bacilo intracelular (71). Além disso, a infecção de camundongos com Mtb mostra que, entre 10 a 20% de todas as células T que respondem ao patógeno são específicas para hsp65 (72). Isso tem tornado esse antígeno um

candidato em potencial para a proteção contra a TB (48).

Uma característica fundamental da vacina de DNA-hsp65 é a capacidade de produzir antígenos endógenos nas células transfectadas dos animais. Isso favorece o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos específicos para o antígeno, os quais produzem IFN- $\gamma$  e lisam os macrófagos infectados pelo Mtb (48,73). Dessa forma, a vacina de DNA-hsp65 torna-se um excelente modo de gerar estas células e pode ser capaz de promover uma proteção duradoura (60).

O uso desta vacina tanto para prevenir como para tratar a TB induz uma mudança no padrão de resposta imunológica, promovendo a ativação de células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas), linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória, bem como de células T gama/delta e células *natural killer* (NK), e secreção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) do padrão Th1 (13,74). A eficiência da vacina de DNA-hsp65 está na indução de uma população de células T específicas, com predominância de linfócitos T citotóxicos, CD8<sup>+</sup> com produção de IFN- $\gamma$  (5). A maioria das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas para o antígeno usado na vacinação ou terapia gênica apresentam alta expressão do marcador de superfície celular CD44<sup>hi</sup>, que é uma molécula presente nas células de memória (67).

A vacina de DNA-hsp65 também impede a reativação da TB em animais imunossuprimidos e, associada à quimioterapia, reduz o tempo de tratamento dos animais (75). Em 1999, a revista *Nature* publicou resultados dessa vacina, que foi capaz de curar casos crônicos de TB e casos de TB latente (64). Além disso, a imunização com a vacina de DNA-hsp65 foi altamente efetiva para proteger animais contra posterior infecção com Mtb (76).

A vacina de DNA-hsp65 não se integra ao genoma do hospedeiro (77), o que é vantajoso, pois a integração do plasmídeo ao genoma do hospedeiro de maneira danosa pode gerar patogenias, principalmente se acontecer em células somáticas, gerando mutagênese por inserção. Além disso, essa vacina apresenta outras vantagens quando comparado ao uso

das vacinas clássicas, como, por exemplo, possui uma produção em grande escala mais barata e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, já que elas são estáveis à temperatura ambiente (69).

Existem evidências de que a vacina de DNA-hsp65 não induz auto-agressão tecidual, o que poderia levar ao desenvolvimento de doenças auto-imunes através de reatividade cruzada com as proteínas de choque término do hospedeiro. Através da análise histológica de 18 órgãos, incluindo cérebro e pulmão, de camundongos vacinados com a vacina de DNA-hsp65 e de animais vacinados e infectados com Mtb, foi verificado que esta vacina não leva à auto-agressão tecidual (78). A imunização com DNA-hsp65 apresentou resultados promissores em modelos animais desafiados com Mtb (59,63,73,79), sendo capaz de curar casos crônicos, TB disseminada, TB latente e TB-MDR (64,75).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tuberculose ainda representa um grave problema de saúde pública mundial, com um número significativo de pessoas infectadas. Apesar da complexidade da resposta imunológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*, este agente consegue escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e manter a infecção. A BCG é a única vacina usada para prevenir esta doença, mas apresenta características negativas, como a variabilidade entre as vacinas usadas e ausência de um efeito duradouro. Dessa forma, há a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para prevenção da TB. Existem muitas pesquisas envolvendo o estudo de estratégias vacinais para o combate dessa doença, sendo uma das alternativas mais estudadas a imunização com DNA-hsp65, que apresentou resultados promissores em modelos experimentais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- (1) COELHO, F. S; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.5, n.2, p.24-26, 2006.
- (2) WHO (World Health Organization). **Global Tuberculosis Report 2014**. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf)>. Acesso em: 09 jul. 2016.
- (3) WHO (World Health Organization). **Global Tuberculosis Report 2015**. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1)> . Acesso em: 09 jul. 2016.
- (4) HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO M. J. Tuberculose - Epidemiologia e Controle no Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.5, n.2, p. 15-23, 2006.
- (5) PEREIRA, B.C; SILVA, J.L.L; ANDRADE, M. Tratamento supervisionado no controle da tuberculose: percepção do enfermeiro nas unidades básicas de saúde. **Informe-se em promoção da saúde**, v.6, n.1, p. 10-13, 2010.
- (6) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. **Panorama da Tuberculose no Brasil**: indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília – DF: Ministério da Saúde, 2014.
- (7) BRASIL.Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Tuberculose**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 15 fev. 2015.
- (8) SEGER, J. **Efeito da vacina gênica para tuberculose (pVAXhsp65) na Encefalite Autoimune Experimental**. 2007, 56p. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais). Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2007.
- (9) LOWRIE, D. B.; SILVA; C. L. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. **Vaccine**, v.18, n.16, p. 1712-1716, 2000.
- (10) GÓMEZ, L.A.; CONDINO NETO, A. O que há de novo em vacinas contra tuberculose? **Rev. Bras. Alerg. Imunopat.**, v.29, n.01, p. 09-13, 2006.
- (11) RODRIGUES L.C.et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomized trial. **Lancet**. v. 366, p. 1290-1295, 2005.
- (12) DANTAS, O.M. et al. A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v.10, n.5, p. 536-541, 2006.
- (13) RODRIGUES JUNIOR, J. M. et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? **J Bras. Pneumol**, v. 30, n. 4, p. 468-477, 2004.
- (14) CAMPOS; H. S. Diagnostico da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.
- (15) LAWN, S.D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, v.378, n. 9785, p. 57-72, 2011.
- (16) LINS, T. B. A. **Coinfecção por *Mycobacterium tuberculosis* e vírus da imunodeficiência humana em hospital terciário em Goiânia, Brasil**. 2012, 106p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- (17) LOPES, J.; JANSEN, J.M.; CAPONE, D. Patogenia e Imunologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.5, n.2, p. 27-34, 2006.
- (18) MELO, F.A.F. et al. Tuberculose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 4 ed. revista e atualizada. São Paulo: Atheneu, 2009.
- (19) HUSSAIN, T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 33, n.1, p. 15-66, 2007.
- (20) BACHA, H.A.; LEITE, O.H.M. Tuberculose no Sistema Nervoso Central. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 4 ed. revista e atualizada. São Paulo: Atheneu, 2009.
- (21) GUPTA, R.K.; KUMMER, S. Central nervous system tuberculosis. **Neuroimaging Clin N Am**, v.21, n.4, p. 795-814, 2011.
- (22) ARAUJO FILHO, J.A. **Estudo da resposta imune celular a antígenos recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* descrição clínico-**

- epidemiológica de portadores de tuberculose nas formas multirresistente e super-resistente em Goiânia, GO.** 2008, 121p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- (23) (23) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília – DF: Ministério da Saúde, 2010.
- (24) (24) BOMBARDA, S. et al. Imagem em tuberculose pulmonar. **J. Bras. Pneumol.**, v.27, n.6, p. 329-340, 2001.
- (25) (25) CASTILLO, E.F. et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.109, n.46, p. 3168-3176, 2012.
- (26) (26) DELANCE, A. R. et al. Tuberculoma of the central nervous system. **J Clin Neurosci.**, v. 20, n.10, p. 1333-1341, 2013.
- (27) (27) KAUFMANN, S.H.E.; DORHOI, A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. **Curr Opin Immunol**, v.25, n.4, p. 441-449, 2013.
- (28) (28) ABEL, B. et al. Toll-Like Receptor 4 Expression Is Required to Control Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **J Immunol**, v.169, n.6, p. 3155-3162, 2002.
- (29) (29) SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr. Opin Immunol.**, v. 17, n.4, p. 374-380, 2005.
- (30) (30) RUSSELL, D.G. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. **Nat. Cell Biol.**, v.5, p. 776-778, 2003.
- (31) (31) YUK, J.M.; JO, E.K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. **Clin Exp Vaccine Res.**, v.3, n.2, p. 155-167, 2014.
- (32) (32) FLYNN, J.L.; CHAN, J.; LIN, P.L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunol**, v.4, n.3, p. 271-278, 2011.
- (33) (33) TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da TB: problemas e estratégias para o sucesso. **J. Bras Pneumol.**, v.33, n.3, p. 323-334, 2007.
- (34) ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico.** 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- (35) ULRICH, T.; KAUFMANN, S.H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol.**, v.208, n.2, p. 261-269, 2006.
- (36) ALGOOLD, H.M.S.; CHAN, J.; FLYNN, J.L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine e GrowthFactorReviews**, v.14, n.6, p. 467-477, 2003.
- (37) ALMEIDA, C.S. et al. Avaliação de novos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* para vacinação e imunodiagnóstico precoce da tuberculose. **Principia: Camin. Inic. Cient.**, v.10, p. 97-106, 2005.
- (38) KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nat. Immunol.**, v.8, n.4, p. 369-377, 2007.
- (39) WINAU, F. et al. Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 Cells and Protect against Tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n.1, p. 105-117, 2006.
- (40) FERRAZ, J.C. et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.39, n.11, p. 1387-1397, 2006.
- (41) RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.144, n.1, p. 25-34, 2006.
- (42) ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2008.
- (43) CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tuberculosis (TB).** 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>>. Acesso em: 09 jul. 2016.
- (44) DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. **Mediterranean**

- Journal of Hematology Infectious Diseases**, Roma, v.5, n.1, p. 1-8, 2013.
- (45) FERRI, A.O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.15, n. 24, p. 105-212, 2014.
- (46) LONGO, D.L. et al. **Medicina Interna de Harrison**. 18 ed., vol. 1, Porto Alegre: AMGH, 2013.
- (47) ZHU, D.; JIANG, S.; LUO, X. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vaccine**, v.23, n.37, p. 4619-4624, 2005.
- (48) SANTOS JUNIOR, R. R. **Avaliação do Efeito da Vacina de DNA-hsp65 na Indução ou Modulação de Diabetes Experimental**. 2006. 112f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.
- (49) MARTIN, C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? **Eur. Respir J**. v.26, n.1, p. 162-167, 2005.
- (50) HASHIMOTO, T. BCG vaccines for the prevention of tuberculosis in the world. **Kekkaku**, v.72, n.11, p. 629-237, 1997.
- (51) FINE, P. E. et al. Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in a rural African population. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.3, n.11, p. 962-975, 1999.
- (52) ORME, I. M. KAUFMANN, S. H. E. Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: A comprehensive review. **Vaccine** v.24, p. 2-19, 2006.
- (53) FREY, J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. **Vaccine**, v.25, n.30, p. 5598-5605, 2006.
- (54) FONSECA, D.M. et al. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunology**, v.121, n.4, p. 508-517, 2007.
- (55) SABLE, S.B. et al. Tuberculosis subunit vaccine design: the conflict of antigenicity and immunogenicity. **Clin Immunol**, v. 122, n.3, p. 239-251, 2007.
- (56) SKEIKY, Y.A. et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J Immunol**, v.172, n.12, p. 7618-7628, 2004.
- (57) BRANDT, L. et al. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. **Infect. Immun.**, v.72, n.11, p. 6622-6632, 2004.
- (58) LANGERMANS, J. A. et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Vaccine**, v.23, n.21, p. 2740-2750, 2005.
- (59) HUYGEN, K. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nat Med**, v.2, n.8, p. 893-898, 1996.
- (60) LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCÓN, R.E. Genetic vaccination against tuberculosis. **Springer Semin Immunopathol.**, v.19, n.2, p. 161-173, 1997.
- (61) ZHU, D. et al. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, v.158, n.12, p. 5921-5926, 1997.
- (62) GONÇALVES, E. D. C. Comparison of the immune response induced by intranasal or intramuscular immunization with phospholipae C from *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.34, p.275, 2001.
- (63) LOWRIE, D.B. et al. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, v.12, n.16, p. 1537-1540, 1994.
- (64) (64) LOWRIE, D.B. et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v.400, n.6741, p. 269-271, 1999.
- (65) PRAZERES, D. M. et al. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. **Biotechnol Annu Rev**, v.7, p. 1-30, 2001.
- (66) SPIER, R.E. International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid (DNA) vaccines.

- Natcher Conference Center NIH, Bethesda, 1996. **Vaccine**, v. 14, n.13, p. 1285-1288, 1996.
- (67) SILVA, C.L. et al. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. **Immunology**, v.97, n.4, p. 573-581, 1999.
- (68) KRIEG, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 709-760, 2002.
- (69) RIBEIRO, A.M. **Vacina de DNA (hsp65 *M. leprae*) para Paracoccidioidomicose Experimental: Atividade Imunogênica e terapêutica**. 2008. 112p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2008.
- (70) SILVA, C. L.; LOWRIE, D. B. A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. **Immunology**, v.82, n.2, p. 244-248, 1994.
- (71) LEE, B. Y.; HORWITZ, M. A. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Invest**, v.96, n.1, p. 245-249, 1995.
- (72) KAUFMANN, S. H. et al. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. **Eur J Immunol**, v.17, n.3, p. 351-357, 1987.
- (73) LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCÓN, R.E. DNA vaccines against tuberculosis. **Immunol Cell Biol.**, v.75, n.6, p.591-594, 1997.
- (74) BONATO, V.L.D. et al. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infec Immunol.**, v.66, n.1, p. 169-175, 1998.
- (75) SILVA, C.L. et al. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. **Gene Therapy**, v.12, n.3, p. 281-287, 2005.
- (76) LOWRIE, D.B.; TASCÓN, R.E.; SILVA, C.L. Vaccination against tuberculosis. **Int Arch Allergy Immunol.**, v.108, n.4, p. 309-312, 1995.
- (77) COELHO-CASTELO, A.A. et al. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. **Genet Vaccines Ther**, v.4, n. 1, p. 1-10, 2006.
- (78) LIMA, D. S. **Avaliação da Vacina DNA-hsp65 na Indução de Auto-Agressão Tecidual**. 2006. 114f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.
- (79) TASCÓN, R.E. et al. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nat Med**, v.2, n.8, p. 888-892, 1996.

Enviado: 19/07/2017  
 Revisado: 20/11/2019  
 Aceito: 26/03/2020