



AIDS

Elena Caride & Amilcar Tanuri
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Departamento de Genética
Laboratório de Virologia Molecular

USO DA BIOTECNOLOGIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA VIVA ATENUADA MAIS SEGURA

No início da década de 80, diversos casos de Sarcoma de Kaposi e pneumonia foram diagnosticados em homossexuais e/ou usuários de drogas injetáveis, nos Estados Unidos e na Europa, sem que um agente etiológico definido fosse identificado. Todos os pacientes apresentavam um quadro de imunodeficiência celular severa, com uma resposta de linfócitos T reduzida. O termo SIDA, ou do inglês AIDS, (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) começou então a ser empregado para definir clinicamente as várias manifestações dessa doença. A década de 80 foi então intitulada a “década da AIDS”, causando preocupação e temor à doença. No entanto, dentro do seu quadro assustador, existia uma ponta de otimismo, de que, com o fim da década, terminaria também a AIDS. No final de 1982, os casos de AIDS nos Estados Unidos não estavam mais restritos aos homossexuais e usuários de drogas injetáveis, mas atingiam também hemofílicos, pessoas que haviam realizado transfusões de sangue, crianças nascidas de mães contaminadas, prostitutas e parceiros de membros de grupo de risco. Até então, o causador da doença não havia sido identificado, mas demonstrava ser um agente etiológico transmissível através do sangue e secreções genitais. Somente em 1983, Barré-Sinoussi e colaboradores detectaram atividade da enzima transcriptase reversa no linfonodo de uma paciente que apresentava síndrome de linfadenopatia persistente. Isso sugeriu que a AIDS pudesse ser causada por um retrovírus, o qual foi denominado inicialmente como “Lymphoadenopathia Associated Virus”. Durante

todo o ano de 1983, e em parte de 1984, diversos pesquisadores estudaram esse novo vírus e novas classificações lhe foram atribuídas, como, por exemplo, HTLV-III. Mas, esse vírus possuía características bem peculiares e bem diferentes daquelas observadas em retrovírus como o HTLV. Embora infectassem o mesmo tipo celular, linfócitos T CD4+, esse novo vírus mostrava altos níveis de partículas virais no sobrenadante das células infectadas e lise destas células. Finalmente, em 1986, o nome Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi unificado para definir o vírus causador da AIDS. Mas somente em 1987 esse vírus foi classificado como membro de um subgrupo distinto no grupo dos retrovírus, o subgrupo dos lentivírus, os quais estão associados a infecções com longos períodos de latência clínica. Assim, a década de 80 chegava ao fim e com ela a esperança de uma cura iminente.

Onze anos mais tarde, a epidemia de AIDS continua a se expandir por todas as regiões do mundo e em 1997 os casos notificados atingiam 30.000.000 de pessoas. Apesar dos esforços da comunidade científica e dos avanços já obtidos, a AIDS continua representando um grave problema de saúde pública, principalmente para os países em desenvolvimento como no caso do Brasil, onde, em 1997, foram notificados 110.845 casos (UNIAIDS 1997). Em meados de 1998, já foram notificados 138.000 casos de AIDS e se estima que existam 550.000 pessoas infectadas com HIV no país.

Essa marcha aterradora do HIV demanda que todos os esforços sejam concentrados na pesquisa de uma vacina eficaz para o combate ao vírus. Essa

seria uma importante arma para deter o avanço da epidemia nos países pobres. Diversas características do HIV devem ser levadas em consideração quando desenharmos uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina. Primeiro, *sua variabilidade*: como outros vírus de RNA, ele muta rapidamente, produzindo viroses antigenicamente heterogêneas, mesmo dentro de um único indivíduo. Atualmente, existem identificados cinco subgrupos de vírus distintos e todos podem ser encontrados na África. Segundo, *seu modo de transmissão*: o HIV é transmitido através da mucosa pelo contato sexual, através do sangue contaminado e da mãe para o feto neonato. Embora a transmissão dos vírus na sua forma livre já tenha sido documentada, a forma de contágio mais comum deve ser pelo vírus associado à célula do hospedeiro. Anticorpos neutralizantes devem ser suficientes para prevenir contra a infecção pelo HIV livre, mas não ao associado a uma célula, que não deve entrar em contato direto com o soro. Ou seja, o desenvolvimento racional de uma vacina deve ser baseado tanto em uma resposta imune humoral, como na resposta celular. Finalmente, *sua célula alvo*: infecções de linfócitos T e macrófagos, os alvos primários do HIV, dependem da ligação das suas proteínas do envelope, com as moléculas de CD4 expressas nas superfícies dessas células.

Outro aspecto importante quando se fala em vacinas para o HIV é a avaliação de sua eficácia. A fim de se validar a eficácia de uma vacina anti-HIV, é necessário que ela seja testada *in vivo*. Sendo assim, diversos modelos animais vêm sendo testados, já que o modelo ideal seria um animal de manutenção barata e que desenvolva uma doença do tipo AIDS, induzida pelo HIV. No entanto, as únicas espécies que podem ser infectadas com o HIV são os grandes macacos, como o chimpanzé e o gibbono, mas estes não desenvolvem AIDS, além de terem um custo elevado de manutenção. Nessa busca por um modelo animal, foi isolado e identificado um novo lentivírus que infecta primatas não humanos, o vírus da imunodeficiência simiana (SIV). Este possui uma alta homologia na sua sequência de DNA com o do HIV, principalmente com o de tipo 2, indicando uma relação evolutiva bem próxima desses dois subgrupos. Esse vírus é um agente infeccioso natural de diversos

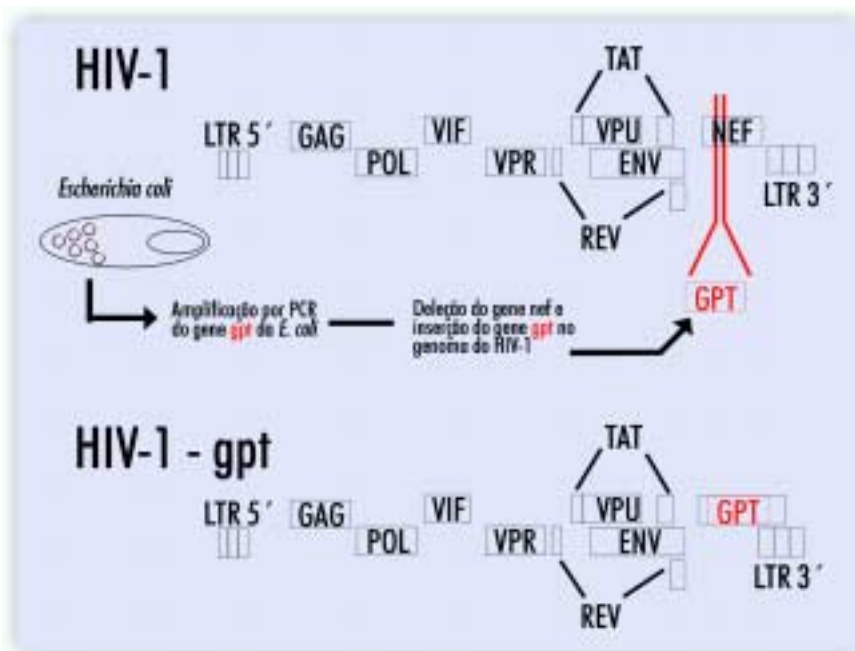


Figura 1- Manipulação genética do HIV.

O material genético do HIV é constituído por duas fitas de RNA polaridade positiva que estão associadas na sua extremidade 5' a uma molécula de tRNA_{lys}. Ambas as fitas de RNA possuem 5'CAP e poliadenilação. Ao longo do RNA, se encontram associados monômeros das proteínas p7/9, que, por sua vez, interagem com as enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease p11. Esse complexo ribonucleoproteico é circundado pela proteína p24, formadora do capsídeo viral. No espaço entre o capsídeo e o envelope, encontra-se a proteína p17; esta é miristilada no seu N terminal, o que promove sua interação com a proteína do envelope gp41. O envelope é constituído por uma bicamada fosfolipídica de origem celular, onde estão inseridas as duas glicoproteínas de origem viral gp120 e gp41. Essas estão associadas não covalentemente, organizando-se em heterotrímeros ou tetrâmeros na superfície do vírion e são as responsáveis pela interação com o antígeno de superfície celular CD4. O genoma do HIV codifica para 3 genes estruturais principais: o gene gag, que codifica uma proteína precursora de 55kDa, que, após a clivagem, vai originar as proteínas p17, p24 e p7/9, formadoras da matriz viral, do capsídeo e do nucleocapsídeo; o gene pol, que é transcrito e traduzido juntamente com o gene gag em uma proteína precursora de 160kDa, após a clivagem, origina, além das proteínas p17, p24 e p7/9, as enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase; o gene env codifica para uma proteína precursora de 160kDa que, depois de clivada, origina as proteínas gp120 e gp 41, que são as glicoproteínas formadoras do envelope viral. Além desses genes, o genoma do HIV codifica para alguns genes acessórios e outros regulatórios, responsáveis por uma série de eventos como: transporte do mRNA viral para o citoplasma (REV), transdução de sinais na célula hospedeira (VPR), formação de canais iônicos na membrana celular (VPU), ativação da transcrição dos genes estruturais(TAT), destruição dos receptores CD4 das células linfocitárias (NEF), etc. Em nossa estratégia de manipulação genética, metade do gene nef foi substituído pelo gene gpt da E. coli, que foi amplificado por uma reação de PCR e utilizado para substituir o gene viral deletado. O clone infectivo foi, então, injetado dentro de células humanas e o novo vírus foi montado e exportado para fora da célula. Esse novo vírus foi nomeado de HIV-gpt.

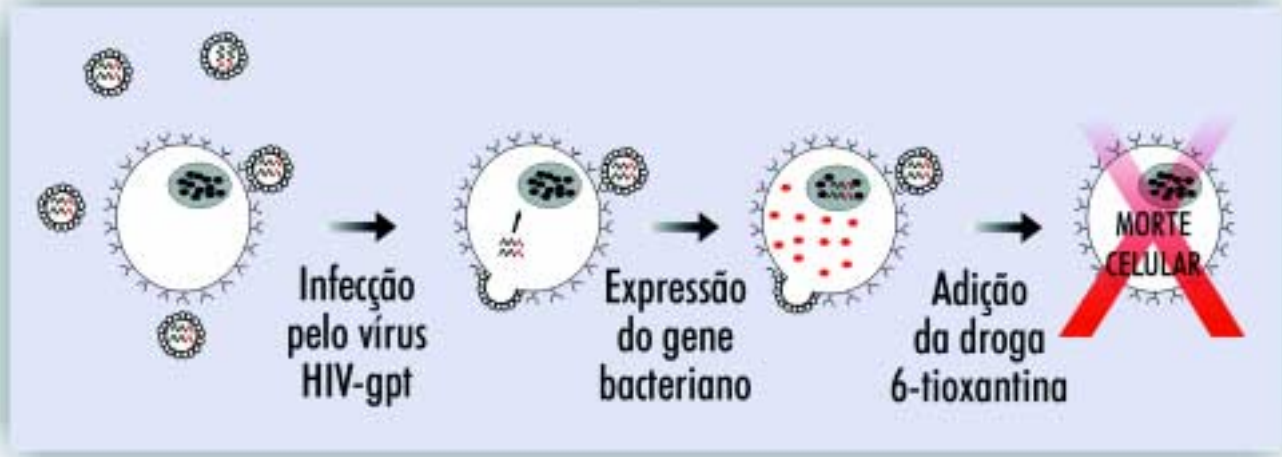


Figura 2- Aborto da infecção de linfócitos humanos pelo HIV-gpt.

O vírus HIV-gpt foi utilizado para iniciar uma infecção em uma cultura de linfócitos humanos, na presença e na ausência de 6-tioxantina. Quando a droga era adicionada à cultura, a enzima gpt, expressa nos linfócitos, era metabolizada e as células infectadas destruídas e, assim, a infecção abortada.

tioxantina que, normalmente, a célula humana não consegue metabolizar, mas, quando infectada com o novo HIV recombinante, incorpora esse produto tóxico no cromossoma e inviabiliza a célula infectada. Assim, utilizando-se uma cópia de cDNA do genoma do HIV clonado em um plasmídeo (clone infectivo) foi feita uma manipulação onde se retirou o gene *nef* e se colocou no lugar o gene *gpt* da *E.coli* (vide Fig. 1). Esse novo vírus agora conseguia replicar em linfócitos humanos, mas, na presença de 6-tioxantina, era totalmente eliminado (vide Fig 2). Dessa forma, achamos que esses resultados demonstram a utilidade desses novos vírus para uma vacina anti-HIV mais segura e eficiente, além de abrir portas para um ensaio em macacos. O mesmo gene suicida está sendo inserido no genoma de SIV para tentarmos essa mesma experiência *in vivo*.

primatas não humanos africanos, mas, normalmente, ele não é patogênico nos seus hospedeiros. No entanto, alguns, quando isolados, induzem uma doença do tipo AIDS em certos macacos asiáticos, caracterizada por uma depleção de linfócitos CD4, imunodeficiência, infecções com agentes oportunistas e tumores. Sendo assim, o SIV é um modelo animal prático para a pesquisa de uma vacina contra o HIV e algum progresso já tem sido alcançado com diferentes protótipos vacinais. Macacos imunizados com vírus completos inativos ou com vacinas que continham subunidades do vírus resistiram à infecção com SIV patogênicos. No entanto, em muitas tentativas de vacinas feitas nos últimos anos, não foi possível induzir uma imunidade duradoura e nenhuma proteção foi conseguida contra isolados de vírus heterólogos, infecções com altas cargas virais ou ainda vírus que não tivessem sido propagados em linhagens celulares humanas. A fim de superar esses problemas, ultimamente vêm sendo conduzidos diversos estudos de vacina utilizando vírus vivos atenuados. Vírus atenuados tem sua patogenicidade reduzida causada primariamente pela sua baixa capacidade replicativa no seu hospedeiro natural. Idealmente, eles não causam a doença, mas induzem a uma resposta imune potente, protegendo o hospedeiro contra uma infecção subsequente com o vírus selvagem. Foi demonstrado que a deleção do gene *nef* no SIV reduz sua patogenicidade. Macacos Rhesus infectados com SIV atenuados por meio de mutações no gene *nef* ficaram protegidos contra uma nova infecção utilizando altas doses de SIV selvagem. A proteína *Nef* é uma proteína miristilada, encontrada somente em lentivírus de primatas. O seu mecanismo de ação ainda

não é bem compreendido, mas diversas evidências apontam para um papel na modulação da transdução de sinais celulares, via interações físicas com proteínas quinase da célula hospedeira. Apesar de esse tipo de estratégia de utilizar vírus vivos atenuados haver demonstrado resultados mais expressivos na tentativa de uma vacina contra AIDS, esse modelo ainda é muito criticado, já que esses vírus têm uma taxa de mutação, e de recombinação com outros vírus muito alta, podendo levar a alterações genéticas que façam com que um vírus não patogênico torne-se patogênico. Recentemente foi descoberto na Austrália um caso de transmissão sanguínea de HIV muito interessante: um doador estava infectado com um vírus que continha uma deleção no gene *nef* por doação de plasma infectou vários receptores. Tanto o doador como os receptores não desenvolveram a doença. Esse fato inusitado foi mais uma forte evidência de que o gene *nef* também está implicado com a patogênese no HIV e isso deu um grande ânimo aos preconizadores desse tipo de vacina anti-HIV.

Nosso grupo vem-se dedicando ao desenvolvimento de uma cepa de HIV atenuada para uma possível vacina. Além da atenuação pela retirada do gene *nef* do genoma do HIV, preocupamo-nos em inserir um gene suicida no genoma viral. A razão de se colocar um gene suicida na amostra vacinal seria para abolir a infecção da amostra vacinal em caso de reversão virulenta. O gene suicida escolhido foi o *gpt* (guanina fosfo-ribosil transferase) e foi doado do cromossoma da bactéria intestinal *E.coli*. O gene *gpt* codifica uma enzima que é capaz de metabolizar uma droga tóxica para as células humanas. Nesse caso específico, é a 6-