

Novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra parasitas

New approaches to parasite vaccines development

SELMA GIORGIO

Professora do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP

RESUMO: Não há vacina contra parasitas para uso em seres humanos. As características dos parasitas e das doenças parasitárias responsáveis pelo atraso na obtenção dessas vacinas são: a cronicidade das infecções, a eficiente evasão do sistema imune e a complexidade na estrutura e nos ciclos de vida dos parasitas. No entanto, atualmente há entusiasmo e esperança na área. As razões para isso são as estratégias de biologia molecular e biotecnológicas, que têm resolvido alguns dos complexos problemas envolvidos no desenvolvimento de vacinas contra parasitas. As estratégias utilizadas atualmente são baseadas na síntese de peptídeos, técnicas de ADN recombinante e imunizações com ácidos nucleicos. Os adjuvantes, que são imunopotenciadores químicos, também estão sendo desenvolvidos para uso nas vacinas contra parasitas.

Palavras-Chaves: BIOTECNOLOGIA – PARASITOLOGIA – VACINAS

ABSTRACT: There is no anti-parasite vaccine for use in humans. Parasite and parasitic disease features which cause problems in attaining these vaccines are: chronicity of infections, high efficiency of immune evasion and structural and life-cycle complexity. Nonetheless, the present time is one of particular enthusiasm in the field. This is because, by appropriately blending molecular biologic and biotechnology approaches it now seems feasible to address many of the complex problems involved in parasite vaccine development. Approaches currently being investigated are the production of vaccines based on synthetic peptides, recombinant DNA techniques, and genetic immunization. Adjuvants (immunopotentiating chemicals) are also being investigated for anti-parasite vaccines.

Keywords: BIOTECHNOLOGY – PARASITOLOGY – VACCINES

Virtually all parasitic diseases are diseases of poverty, and the long-term solution to their control is to eliminate poverty rather than to develop biomedical tools or intervention packages.

(M. Tanner & D. Evans, 1994)¹⁶

A observação de Tanner e Evans, em recente artigo na revista *Parasitology Today*, expressa a opinião de muitos pesquisadores da área de Parasitologia.^{4, 8, 9, 11} Contudo, as ferramentas biológicas mencionadas pelos autores como as vacinas, que discutiremos nesse artigo, e os quimioterápicos são de grande importância, senão para a resolução completa do problema, pelo menos para a redução do sofrimento dos indivíduos que vivem em áreas afetadas.

Todos os agentes infecciosos são parasitas. No entanto, por convenção o termo é reservado aos protozoários, helmintos e

artropodes ectoparasitas. O impacto das doenças causadas por esses parasitas nas populações principalmente dos países subdesenvolvidos é ainda hoje muito grande. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com algum parasita e que o número anual de mortes devido às doenças parasitárias esteja na casa dos milhões.^{15, 19} Uma lista de algumas das principais parasitoses, prevalências, mortalidades e estratégias atuais de controle encontra-se na tabela. Nota-se que nas infecções listadas, e em qualquer outra parasitose humana, as vacinas não fazem parte dos métodos de controle.

Infecção	Prevalência Global	Mortalidade Anual	Métodos de Controle
Malária	300 milhões	1 milhão	controle do vetor, quimioterapia
Esquistossomose	200 milhões	800.000	controle do vetor, higiene
Filariose	78,6 milhões	baixa	controle do vetor, higiene
Doença de Chagas	18 milhões	45.000	controle do vetor
Leishmaniose	12 milhões	70.000	controle do vetor, quimioterapia
Tripanossomíase Africana	1 milhão	5.000	controle do vetor
Dados compilados das referências 15 e 19			

Tabela 1 – Principais Doenças Parasitárias: prevalência, mortalidade e métodos de controle.

De fato, o desenvolvimento de vacinas contra parasitas tem sido um desafio para várias gerações de cientistas. Ainda hoje nenhuma vacina contra esse grupo de patógenos foi utilizada em grande escala, estando algumas em testes clínicos (por exemplo,

malária e leishmaniose) e outras em fase experimental (por exemplo, esquistossomose e toxoplasmose).¹¹ Por que os cientistas que pesquisam essas doenças descritas há muitas décadas (leishmaniose, 1898; doença de Chagas, 1908; malária, 1890; esquis-

tossomose, 1851, e toxoplasmose, 1909) não encontraram fórmulas de imunização adequadas? Para responder a essa questão, é necessário discutir alguns aspectos imunopatológicos das infecções.

As vacinações contra um grande número de doenças virais e bacterianas têm sido um sucesso nos últimos anos. Para citar apenas dois, são exemplos disso a erradicação mundial da varíola e a eliminação da poliomielite em vários países. As razões para tal sucesso residem nas características da maioria das infecções causadas por vírus e bactérias: episódios agudos da doença, respostas imunes que levam a um completo *clearance* do patógeno ou a uma redução de seu número em níveis muito baixos e a resistência a reinfeção. No caso das doenças parasitárias em populações humanas, essas apresentam um largo espectro de manifestações clínicas (de indivíduos assintomáticos a pacientes crônicos). O aparecimento de infecções crônicas sugere que as respostas imunes antiparasita desenvolvem-se lenta e ineficientemente. As respostas imunes também são multifatoriais, isto é, a natureza da resposta varia de um indivíduo para o outro, com o concomitante aparecimento de mecanismos de escape ao sistema imune, desenvolvido pelos parasitas. Além disso, parasitas são estrutural e bioquimicamente mais complexos que vírus e bactérias, com muitas espécies apresentando várias formas evolutivas em seus ciclos de vida, o que dificulta a definição de antígenos protetores (moléculas do microorganismo que provocam resposta imune protetora).⁹

Apesar das imensas dificuldades, parasitologistas e imunologistas estão desenvolvendo novas tecnologias para a obtenção de vacinas e entendendo melhor os parasitas do ponto de vista genético e bioquímico. Nosso objetivo é discutir as estratégias utilizadas e as perspectivas de desen-

volvimento de novas vacinas contra os parasitas.

ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA PARASITAS

As vacinas, de um modo geral, são compostas de um dos seguintes tipos de preparações:

- microorganismos atenuados, mortos ou inativados (vacinas contra a raiva, cólera e salmonelose);
- extratos e produtos metabólicos (vacina contra o tétano);
- subunidades do patógeno, como os antígenos recombinantes produzidos por engenharia genética e os peptídios sintéticos (vacina contra hepatite B).²

Apesar de se observar imunização efetiva com parasitas atenuados ou mortos por irradiação (caso do *Plasmodium* e do *Trypanossoma cruzi*), na prática médica tal procedimento seria muito complexo. O número de parasitas necessários para uma vacinação em massa seria elevadíssimo, e para o cultivo dessas formas é necessária a presença de células do hospedeiro vertebrado, o que torna tal procedimento inviável do ponto de vista econômico, além dos riscos inerentes das culturas celulares (presença de oncogenes, micoplasmas etc...). Aliado a essas dificuldades, está o risco de que os processos de atenuação não sejam efetivos em 100% dos parasitas utilizados, o que poderia provocar infecção no lugar de imunização.^{8, 9, 10}

A solução para esses problemas está na obtenção de antígenos purificados dos parasitas capazes de estimular uma resposta imune protetora e de longa duração nos indivíduos vacinados. Para alcançar esse objetivo, os pesquisadores da área lançam mão de algumas estratégias de estudo.¹⁵

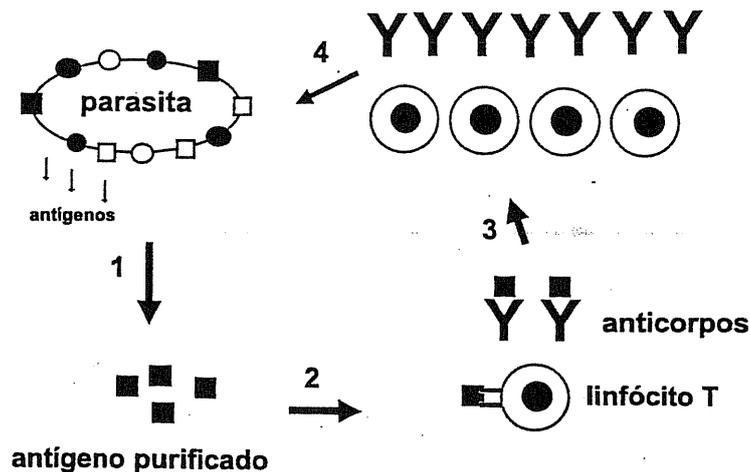


Figura 1 – Esquema simplificado dos estágios de desenvolvimento e da ação de vacinas contra parasitas.

(1) Pesquisadores estudam, purificam e sintetizam um antígeno do parasita com potencial protetor; (2) o antígeno, quando usado em imunizações, é capaz de induzir respostas imunes, como ativação de linfócitos T e produção de anticorpos; (3) e (4) o hospedeiro com anticorpos e linfócitos específicos em número aumentado, devido à imunização, é capaz de debelar a infecção pelo parasita.

A produção de anticorpos monoclonais protetores específicos para antígenos do parasita, a identificação bioquímica desses antígenos (por exemplo, a presença de açúcares e lipídios e a seqüência de aminoácidos), os testes de imunização em animais de laboratório com essas moléculas e finalmente a clonagem do gene e produção do antígeno recombinante ou sintético foram os passos seguidos para o desenvolvimento da vacina contra a malária.^{10, 13, 14}

Apesar de efetiva para obtenção de antígenos protetores em vários modelos de doenças parasitárias, utilizando-se tal estratégia assume-se que a imunização efetiva envolva a resposta imune do tipo humoral, isto é, a produção de anticorpos contra o parasita. Essa premissa, entretanto, é incorreta, pois é a resposta imune do tipo celular (ativação de linfócitos T e produção de linfocinas) que está

envolvida na resistência à infecção por muitos protozoários e helmintos.

Outra estratégia muito utilizada é o estudo dos mecanismos efetores de resistência e o desenvolvimento de protocolos de vacinação com extratos totais ou parasitas atenuados, que induzam proteção em animais experimentais. Feito este estudo, identificam-se e sintetizam-se os antígenos relevantes. Trabalho desse tipo é desenvolvido na esquistossomose e na leishmaniose experimental, e com a vantagem de definir a metodologia (por exemplo, a via de inoculação e as células-alvo estimuladas) para a apresentação dos antígenos protetores ao sistema imune, antes mesmo da purificação completa das moléculas.¹⁵

A terceira estratégia que os pesquisadores adotam para desenvolver vacinas contra os parasitas é a identificação de moléculas vitais, isto é, que fazem parte de processos fisiológicos do parasita. Enzimas e receptores envolvidos na ligação ou adesão a células do hospedeiro são alguns dos candidatos que poderão ser alvo da resposta imune protetora.

ADJUVANTES

O objetivo das diferentes estratégias discutidas acima é a obtenção de proteínas

purificadas ou recombinantes ou mesmo peptídios do parasita. Infelizmente, tem-se observado que tais moléculas apresentam uma imunogenicidade limitada, isto é, a eficiência em estimular uma resposta imune intensa e de longa duração é baixa. Para contornar esse problema, pesquisa-se maneiras de aumentar a imunogenicidade dos "candidatos" a vacinas. Um dos campos mais promissores é o desenvolvimento de adjuvantes, imunopotenciadores químicos que, misturados ao antígeno purificado, têm por função amplificar e intensificar respostas imunes humoral e/ou celular específicas.^{1, 7, 14}

O único adjuvante utilizado em seres humanos ainda é o hidróxido de alumínio (usado nas vacinas contra difteria, tétano e hepatite B), que não é tóxico, mas deficiente na estimulação de respostas mediadas por linfócitos T. Outros como o adjuvante completo de Freund (uma emulsão água-óleo mineral e micobactérias mortas) são tão tóxicos que não se prestam nem ao uso em vacinas veterinárias.

Uma nova geração de adjuvantes tem sido desenvolvida e já mostra os primeiros resultados. O composto Ribí, que contém em sua formulação lipídio A e parede celular de micobactéria, está sendo testado com a vacina da malária. Outros, como os lipossomos (bicamadas concêntricas de fosfolipídios que se formam espontaneamente em solução aquosa), são usados em pesquisas de leishmaniose experimental e os "iscoms" — abreviação do inglês *immunostimulatory complexes* (um glicosídeo extraído da casca da árvore *Quillaja saponaria*) — estão em testes de toxicidade.

Os mecanismos gerais de ação dos adjuvantes não estão esclarecidos; mas há algumas hipóteses. Esses compostos devem reter o antígeno no local em que a injeção é aplicada, liberando-o depois vagarosamente, dando às células do sistema imune tempo para detectá-lo e acionar a resposta eficaz. Adjuvantes devem

também atrair células mononucleares para o local da injeção, elevando o número de linfócitos nos órgãos linfóides próximos e facilitando o contato entre o antígeno e as células do sistema imune. Os antígenos, quando misturados a adjuvantes, devem ser incorporados (fagocitados) e processados mais eficientemente por macrófagos. O uso desses compostos em humanos, no entanto, dependerá sempre da superioridade que apresentem sobre o hidróxido de alumínio e da falta de efeitos tóxicos.^{1, 7}

VACINAS DE ÁCIDO NUCLEICO: A TECNOLOGIA DOS ANOS 90

A técnica mais moderna para vacinação e que pode revolucionar o campo é a das vacinas de polinucleotídeos.^{5, 8, 14, 18} O princípio do método baseia-se na observação de pesquisadores da Vical, uma empresa de biotecnologia em San Diego, Califórnia (EUA), da Merck e da Marinha americana, que injetaram plasmídeo que continha (codificava) o gene de um antígeno do vírus da influenza no quadríceps (músculo esquelético) de camundongos. Após a imunização, os animais foram inoculados com o próprio vírus da influenza e se mostraram resistentes à infecção. Várias imunizações desse tipo foram realizadas em bovinos, aves e primatas com grau satisfatório de proteção.

Esses resultados mostraram que o ADN (ácido dexosiribonucleico) que codifica uma proteína do patógeno, quando injetado em músculo, pode estimular o tecido do hospedeiro para sintetizar essa proteína, que, por sua vez, será reconhecida pelo sistema imune como *estranha*, provocando respostas protetoras.⁵ A técnica é revolucionária porque o próprio hospedeiro produzirá a proteína antigênica, similar a produzida pelo patógeno e evitará os complicados protocolos de purificação e síntese dessas proteínas que são realizados nos laboratórios. Essas vacinas terão vantagens na eficácia, pois o sistema imune terá contato prolongado com o antígeno produzido *in loco* e ocorrerá a

estimulação dos linfócitos T citotóxicos "matadores" de células infectadas e dos anticorpos protetores. Haverá vantagem do ponto de vista econômico também, uma vez que os custos para a produção dessas vacinas de ácidos nucleicos poderão ser menores, pois as etapas de síntese e/ou purificação antigênica não serão necessárias e a estabilidade da vacina é maior, desde que o ADN não necessita ser mantido em condições especiais, em temperaturas muito baixas ou com estabilizadores químicos.

As primeiras tentativas de vacinação em animais de laboratório com genes de antígenos de parasitas já foram realizadas e os resultados são muito promissores. No caso da leishmaniose experimental, pesquisadores ingleses imunizaram camundongos com o "gene" de uma glicoproteína de peso molecular de 63.000 Daltons, previamente estudada e definida como uma das "candidatas" à vacina contra a leishmaniose cutânea. O desafio com parasitas vivos originou respostas imunes protetoras com diminuição significativa no tamanho das lesões.¹⁷ Experimentos também foram realizados com gene da proteína CS (*circumsporozoite protein*) do *Plasmodium* e os níveis de proteção observados foram altos. O ADN de *Schistosoma japonicum* está sendo utilizado para proteção de animais contra o *S. mansoni*.¹⁸ Os próximos anos, sem dúvida, reservarão surpresas em relação a essa nova descoberta da imunologia.

O EXEMPLO DA VACINA DA MALÁRIA

A malária é uma parasitose que acompanha a humanidade há dezenas de milhares de anos. Ainda hoje, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, há 100 milhões de casos por ano. No Brasil registra-se de 600 a 800 mil casos anuais, a maioria da região amazônica.³

O ciclo evolutivo do protozoário

Plasmodium, o parasita da malária, é complexo, mas vamos descrevê-lo resumidamente, salientando algumas fases. Um anofilíneo fêmea (vetor da doença) durante um repasto sanguíneo injeta a forma esporozoíta do parasita em um hospedeiro. Rapidamente essas formas movem-se através da corrente sanguínea para o fígado, onde no interior dos hepatócitos transformam-se em esquizontes. Esses contêm centenas de merozoítos, que ganharão novamente a corrente sanguínea e em segundos infectam os glóbulos vermelhos, onde ocorre a replicação assexuada do parasita. O ciclo continua e os sinais de anemia e febre são característicos, complicações cerebrais são observadas em infecções por *P. falciparum*.

Há décadas pesquisadores procuram meios de imunizar e, assim, proteger indivíduos da malária.¹⁰ Nessas tentativas, observou-se que voluntários expostos (imunizados) a anofilíneos contendo esporozoítas irradiados estavam protegidos da infecção por *Plasmodium*. Como discutido anteriormente, esse tipo de imunização seria inviável em escala até mesmo regional. Iniciou-se, então, as pesquisas dos antígenos protetores, isto é, aqueles que induziriam uma resposta imune efetiva. Dentre as dezenas de moléculas pesquisadas, a proteína CS (*circumsporozoite protein*) presente em toda a superfície do esporozoíta mostrou-se imunogênica e protetora. Animais de laboratório vacinados com proteína CS produziram anticorpos que eram capazes inibir a entrada do parasita nos hepatócitos, impedindo, assim, a multiplicação e a transformação em merozoítos. As primeiras tentativas de vacinação em primatas não foram bem sucedidas. Mas, em 1987-1988, pesquisadores colombianos publicaram alguns artigos^{11,12} descrevendo a ação de uma vacina sintética em macacos do gênero *Aotus* e em um pequeno número de voluntários, os resultados apresentaram um índice de proteção de 70 a 80%. A vacina,

conhecida com Spf66, consiste de uma combinação de peptídios sintéticos, os quais têm seqüências de aminoácidos originadas das seqüências derivadas das proteínas CS, MSA-1 (*merozoite surface antigen 1*) e outras proteínas da forma merozoíta.

Apesar de outros grupos de pesquisa não terem conseguido repetir os resultados produzidos pela vacina Spf66 em macacos, os cientistas colombianos liderados pelo Dr. M.E. Patarroyo iniciaram os testes em grande número de voluntários em regiões da América do Sul e da África. Os resultados mais recentes apontam uma redução de 39% nos episódios clínicos da malária nos indivíduos vacinados. ⁶ A Organização Mundial da Saúde está acompanhando os testes clínicos e tem unido esforços com os pesquisadores no sentido de melhorar a eficácia da Spf66 e comprovar seu potencial protetor em diferentes regiões do globo.

Pode-se discutir que a eficácia de 39% obtida dessa vacina é ainda pequena, mas considerando os países em que a malária é endêmica e mata, mesmo uma vacina que reduza o risco da infecção em aproximadamente um terço da população é muito bem vinda.

CONCLUSÃO

As dificuldades encontradas por cientistas que trabalham na área de vacinas contra parasitas são muitas. Além de as doenças provocadas por esses microorganismos apresentarem um largo espectro de manifestações clínicas e das respostas imunes do hospedeiro desenvolverem-se lenta e ineficientemente, esses parasitas são bioquimicamente mais complexos que os vírus e as bactérias.

Apesar desses desafios, as estratégias recentes prometem um desenvolvimento de vacinas contra os parasitas. Os conhecimentos das respostas imunológicas efetoras e da bioquímica, aliados a biotecnologia, são responsáveis por essas expectativas. O mapeamento bioquímico e genético dos parasitas está possibilitando a produção de peptídios sintéticos e recombinantes, que são testados clinicamente e experimentalmente quanto aos seus potenciais protetores. Os primeiros bons resultados já foram obtidos no caso dos antígenos sintéticos Spf66 contra a malária.

O avanço da área dependerá do contínuo aprimoramento das técnicas biotecnológicas, do conhecimento bioquímico e genético dos parasitas e também dos estudos das respostas imunes efetoras dos hospedeiros contra seus parasitas.

NOTAS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUDIBERT, F.M., LISE, L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunology Today*, v. 14, p. 281-284, 1993.
2. BEARDSLEY, T. Better than a cure. *Scientific American*, v. 272, p. 68-75, 1995.
3. CAMARGO, E.P. A malária encenada no grande teatro social. *Estudos Avançados*, v. 9, p. 211-228, 1995.
4. CERAMI, A. Drug. *Parasitology Today*, v. 10, p. 404-406, 1994.
5. COHEN, J. Naked DNA points way to vaccines. *Science*, v. 259, p. 1691-1692.
6. COX, F.E.G. That vaccine passes a trial. *Nature*, v. 362, p. 410, 1993.
7. GIORGIO, S. Vacinas contra parasitos. *Ciência Hoje*, v. 11, p. 8, 1990.
8. MILON, G. Drugs or vaccines? *Parasitology Today*, v. 10, p. 402-404, 1994.
9. MITCHELL, G.F. Problems specific to parasite vaccines. *Parasitology*, v. 98, p. S19-S28, 1989.

10. NUSSENZWEIG, R.S., LONG, C.A. Malaria vaccines: multiple targets. *Science*, v. 265, 1381-1383, 1994.
11. PARASITOLOGY. Número especial em *Science*, v. 264, p. 1857-1886, 1994.
12. PATARROYO, M.E. e outros. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature*, v. 328, p. 629-632, 1987.
13. PATARROYO, M.E. e outros. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v. 332: 158-161, 1988.
14. RABINOVICH, N.R. e outros. Vaccine technologies: view to the future. *Science*, v. 265, p. 1401-1404, 1994.
15. SCOTT, P.A., SHER, A. Immunoparasitology. Em: PAUL, W.E (ed.) *Fundamental immunology*. New York: Raven, 1993.
16. TANNER M., EVANS D. Vaccines or drugs: complementarity is crucial. *Parasitology Today*, v. 10, p. 406-407, 1994.
17. XU, D., LIEW, F.Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, v. 84, p. 173-176, 1995.
18. WAINE, G.J., McMANUS, D.P. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitology Today*, v. 11, p. 113-116, 1995.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Eleven Programme Report. UNDP/World Bank/WHO Special Programme from Research and Training in Tropical Diseases*, Geneva, 1993.

(Recebido em 11.1.96)