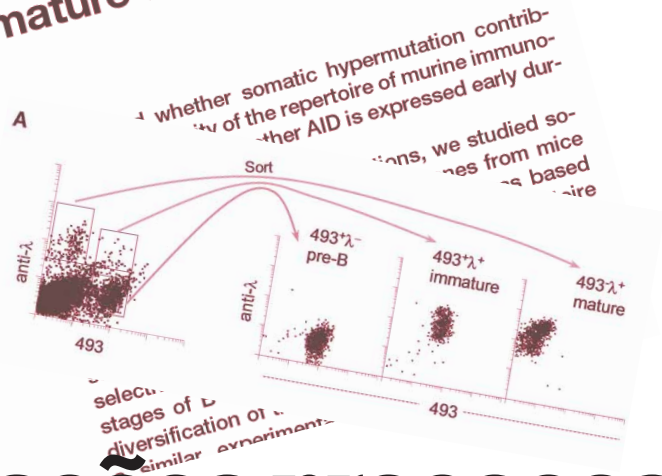


T Cell-Independent Somatic Hypermutation in Murine B Cells with an Immature Phenotype

Changchun Mao,¹ Liying Jiang,¹ Milena Melo-Jorge,¹ Maya Puthenveetil,¹ Xiuli Zhang,¹ Michael C. Carroll,² and **Thereza Imanishi-Kari**^{1,*}
¹Department of Pathology and Program in Immunology, Tufts University School of Medicine and Sackler School of Graduate Biomedical Sciences, Boston, Massachusetts 02111
²The CBR Institute for Biomedical Research and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115



As mutações precoces

Uma cientista brasileira descobre que a extraordinária variedade das células do sistema imunológico começa a se formar mais cedo do que se imaginava

Ana Rogge e Raimundo Rodrigues Pereira

1. De volta à ciência

O mais famoso artigo da doutora Thereza Imanishi-Kari é de 1986 e tem um título aparentemente incompreensível: *Altered Repertoire of Endogenous Immunoglobulin Gene Expression in Transgenic Mice Containing a Rearranged Mu Heavy Chain Gene*. Sua repercussão no Brasil foi enorme; no entanto, a *Folha de S. Paulo* publicou um artigo destacado reproduzindo as acusações de fraude que foram feitas nos Estados Unidos contra a pesquisadora, que é brasileira. E, a despeito de procurada pela família da cientista, que argumentou que era um erro endossar uma acusação de fraude contra um artigo que sequer havia se esforçado para entender, a *Folha* jamais se retratou das acusações, ao contrário do que fez outro jornal liberal, *The New York Times*, quando ela foi absolvida de todas as acusações pelo governo dos EUA em 1996 (veja nosso *Ponto de Vista*, na página 7).

Neste início do ano, como se verá a seguir, a pesquisadora brasileira voltou ao noticiário científico internacional com um artigo surpreendente sobre o processo de formação da gigan-

tesca diversidade dos anticorpos, as células de defesa do sistema imunológico dos animais. Para entender seu trabalho, pode-se começar traduzindo o título do artigo que lhe valeu a perseguição por dez anos: *Alteração do Repertório de Expressão dos Genes de Imunoglobulina Endógenos em Camundongos Transgênicos Contendo um Gene de Cadeia Pesada Mu Rearranjado*. Tentando esclarecer mais, por partes:

1) *Repertório*. No seu código genético interno, localizado no núcleo das células, assim como têm genes que definem a cor de seus olhos, os animais têm também genes que podem produzir uma variedade enorme de anticorpos, as proteínas de defesa do organismo, chamadas também de imunoglobulinas. Os animais, portanto, podem expressar um repertório de genes de imunoglobulina endógenos. 2) *Cadeia pesada Mu*. As imunoglobulinas são cadeias de átomos com uma forma especial, adequada para sua função: agarrar, marcar os antígenos, os elementos que invadem o corpo. Para isso, têm como se fossem garras, estruturas em forma de Y armadas com quatro séries de átomos – duas menores, as *cadeias leves*, que são como

reforços dos braços do Y; e duas maiores, de alto a baixo do Y, as *cadeias pesadas*.

3) *Rearranjo*. Ao contrário da cor dos olhos, a diversidade da resposta imunológica não nasce pronta no animal: ela se desenvolve ao longo de sua vida. Isso é possível porque as células B, que fazem os anticorpos, executam um movimento especial, de *rearranjo* dos genes das imunoglobulinas. O repertório de imunoglobulinas tem entre 500 a 1000 genes, de sete tipos. Cada tipo está num trecho diferente do DNA do animal. Além dessa, há outra separação: os genes da cadeia pesada (quatro tipos) estão num dos cromossomas, as cápsulas com os pedaços do código genético. Os genes da leve (três tipos) estão em outro cromossoma. Durante os ataques por antígenos, para produzir um anticorpo específico contra o invasor, de alguma forma a maquinaria da célula B *rearranja seus genes*: seleciona os que precisa, dispensa os que não são necessários, para que possa produzir em quantidades maciças o tipo de cadeia leve e o tipo de cadeia pesada que melhor servem para formar a estrutura que capture o inimigo.

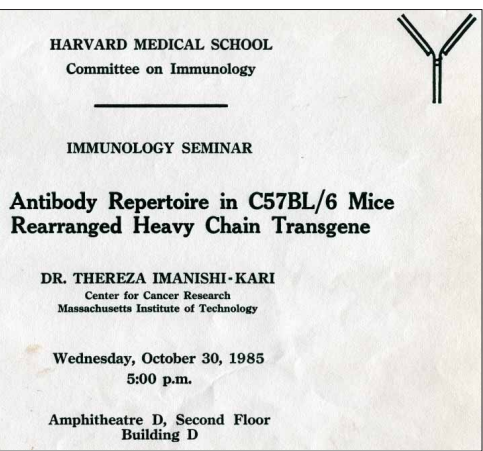
4) *Transgênico*. A experiência descri-

ta no artigo da *Cell* foi feita com um camundongo que tinha inserido em seu patrimônio genético, ao nascer – antes portanto de ter sofrido qualquer ataque por antígeno – os quatro genes necessários para fazer uma determinada cadeia pesada de anticorpo já rearranjados, já prontos para expressar aquela cadeia, chamada de mu (lê-se *mi*, uma letra grega).

O novo artigo de Thereza estuda o processo de diferenciação das células B de outro ângulo, das mutações que elas sofrem durante o seu processo de multiplicação e das relações que elas têm com células auxiliares no processo de defesa do organismo, as células T. Basicamente, as células B produzem as proteínas que marcam o organismo estranho para destruição e as T atacam localmente o invasor e destroem células infectadas. Os receptores das células B e T, que servem de encaixe para os antígenos, se formam quando elas são imaturas, no processo de rearranjo genético, citado antes. Por não ser muito preciso, esse rearranjo dá origem a muitas formas de receptores diferentes, e é uma das bases da diversidade dos anticorpos.

O outro processo que aumenta a diversidade da resposta imune é a *mutação somática*. A certa altura da defesa imune, as células B específicas para atacar determinado antígeno começam a se multiplicar intensamente. Nesse processo elas não se reproduzem sempre da mesma forma: sofrem mudanças pontuais no seu código genético, em consequência de perturbações físicas ou de agentes químicos do meio onde se reproduzem.

Até o trabalho de Thereza e seus auxiliares, achava-se que esse processo de mutação não ocorria no centro de formação do sistema imune, que é a medula espinhal, mas na periferia dele, no baço, nos nódulos linfáticos. E, além disso: 1) apenas nas células maduras; e 2) na presença das células T. No artigo na *Immunity*, Thereza e pes-

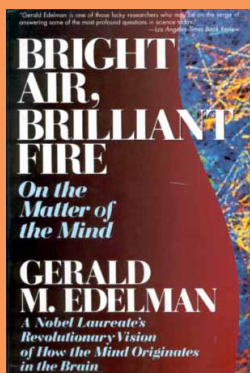


1985, 30 de outubro: o convite para palestra de Thereza no MIT, para expor as conclusões do paper famoso

quisadores de seu laboratório em Tufts mostram que a evolução das células B não segue o padrão que se imaginava: as células B imaturas, na medula, também sofrem mutações e, para isso, não precisam da presença das células T auxiliares. A experiência (*T Cell Independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype* - Hipermutações somáticas independentes das cé-

O sistema imune e o cérebro

O neurologista Gerald Edelman, prêmio Nobel de Medicina de 1972, foi também imunologista, por 15 anos. No seu livro *Bright Air, Brilliant Fire*, que apresenta uma visão revolucionária de como se forma a consciência no cérebro humano, usa a imunologia como ponto de partida para sua teoria. Um sistema imunológico devidamente estimulado, diz ele, pode distinguir duas proteínas estranhas, formadas por milhares de átomos de carbono, e que difiram uma da outra apenas por uns poucos graus na inclinação de uma única cadeia de átomos. E, uma vez feita essa distinção, o sistema tem a habilidade de repetir o fato – tem uma memória, portanto. Achava-se, diz Edelman, que a habilidade de reconhecimento era uma transferência de informação do corpo estranho para os anticorpos: o antígeno deixava sua marca no anticorpo, e essa marca era depois replicada para servir de engate e captura desses invasores. Hoje, diz Edelman, a teoria é outra: o desenvolvimento de uma multidão de anticorpos para atingir uma determinada forma invasora não é principalmente uma transferência de instruções de fora para dentro do organismo; antes de se encontrar com qualquer molécula estrangeira, o sistema imune tem a habilidade de fazer um enorme repertório de formas de anticorpos.



Quando invade um organismo, uma molécula estrangeira encontra uma população de células de formas diferentes e é encaixada por aquela cuja forma lhe é complementar. Quando esse encaixe ocorre, isso estimula o anticorpo a se multiplicar. Edelman diz então que o sistema imune é um sistema de reconhecimento, que se desenvolve pela evolução e pela experiência. Ele não precisa da informação de fora para existir; precisa para desenvolver-se. Com o cérebro, acontece coisa parecida, diz ele. E isso resolve um problema crucial de uma teoria materialista para explicar a mente humana: a hipótese de que o cérebro é um sistema de reconhecimento seletivo nos alivia do horror de ter de imaginar os homúnculos dentro do cérebro humano que, por sua vez, teriam homúnculos em seus cérebros, e assim por diante. A diversidade existe antes; a especificidade da resposta decorre da seleção feita *a posteriori*. Nós não temos mais a necessidade de uma infinidade de processadores de informação na nossa cabeça, diz Edelman: a idéia de que o cérebro se desenvolve por instruções externas, requer que ele tenha alguém ou algo para ler essas instruções. Por sua vez, essa entidade precisaria de outra semelhante, para ler as mensagens resultantes, e assim indefinidamente.

100-2-11

ORIGINAL
BY AUTHORITY OF THE HOUSE OF REPRESENTATIVES OF THE CONGRESS OF THE
UNITED STATES OF AMERICA

To Peter D.H. Stockton and/or Bruce F. Chafin and/or Federal Express

You are hereby commanded to summon Thereza Imanishi-Kari, Ph.D.
Department of Pathology, Tufts University, 136 Harrison Street,
Boston, Massachusetts 02111

to be and appear before the Subcommittee on Oversight and Investigations, Energy and
Commerce
Committee of the House of Representatives of the United States, of which the Hon.
John D. Dingell is chairman, (and to bring with
her the documents described in the attachment appended hereto). Personal
appearance is excused if the items referenced in the attachment hereto
are received in the Subcommittee offices (2323 Rayburn House Office Building)
by 10:00 a.m. on Wednesday, July 13, 1988
in their chamber in the city of Washington, on Thursday, July 14, 1988
2123 Rayburn House Office Building, at the hour of 10:00 a.m.

then and there to testify touching matters of inquiry committed to said Committee; and he is
not to depart without leave of said Committee.

Herein fail not, and make return of this summons.

Witness my hand and the seal of the House of Representatives
of the United States, at the city of Washington, this
30th day of June, 1988.

John D. Dingell
Chairman

Attest: *Donald K. Anderson*
Clerk

1988, 30 de junho: a intimação do deputado John Dingell, para que Thereza comparecesse ao Congresso dos EUA, com suas pesquisas, para depor

lulas T em células B de camundongos com um fenotipo imaturo) usou quatro camundongos geneticamente modificados, capazes de produzir apenas um número restrito de anticorpos, para facilitar o trabalho de identificação.

Pesquisadores franceses obtiveram resultados com células humanas que confirmam essa tese. O resultado é surpreendente. Uma das características básicas das células pré-maduras é que elas ainda não são específicas o suficiente para reconhecer apenas o organismo invasor. São anticorpos com uma característica distinta: sua forquilha, a parte do anticorpo que reconhece e se acopla à substância invasora, se acopla também em outras células. Isto porque vários mecanismos necessários para fortalecer a diversidade genética ainda não foram iniciados. À medida que a produção de anticorpos aumenta – depois do ataque invasor –, apenas as células mais específicas em se acoplar ao antígeno são estimuladas a se dividir, produzindo assim a resposta imune massiva e específica desejada. Segundo Thereza, uma possível explicação para estas mutações já tão cedo no desenvolvimento celular “é evitar o ataque das células do próprio corpo”. A falta de especificidade, uma ca-

provocado pela reação das células do sistema de defesa do organismo contra células normais do próprio corpo. Doença, inclusive, de que a própria imunologista é vítima.

2. No mar do sistema linfático

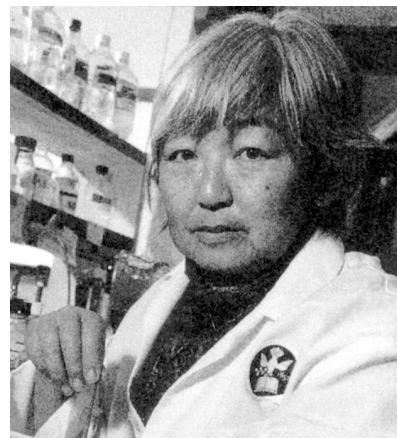
Thereza é uma imunologista, possivelmente uma das melhores do mundo nessa especialidade. Formou-se na USP e fez mestrado no Japão. Estava na Europa em 1981, quando foi chamada pelo MIT. A razão do convite: seu trabalho na identificação de anticorpos muito especiais para o estudo do sistema imunológico de animais de laboratório. Thereza estivera na Finlândia, com Oli Makela, um dos grandes nomes da imunologia mundial. A imunologia é a ciência da exploração do sistema linfático – medula, timo, baço, nódulos e vasos. Por esse sistema circula a miríade de anticorpos que defende o animal dos exércitos de elementos invasores. Um camundongo adulto, por exemplo, pode produzir dez milhões de tipos diferentes de imunoglobulinas. Um imunologista bom é aquele que sabe navegar nesse mar de

racterística comum de células pré-maduras e que aparece nas doenças auto-imunes, quando o sistema imunológico ataca células do próprio organismo, seria uma das razões. “As células querem evitar a morte”, observa a cientista. Nessas situações, elas são capazes de sofrer hipermutações com o intuito de evitar o auto-acoplamento. A pesquisa pode ajudar a desvendar os mistérios de doenças crônicas, relacionadas com o sistema imune, como o *lupus eritematoso sistêmico*, que causa inflamação em vários órgãos do corpo e é

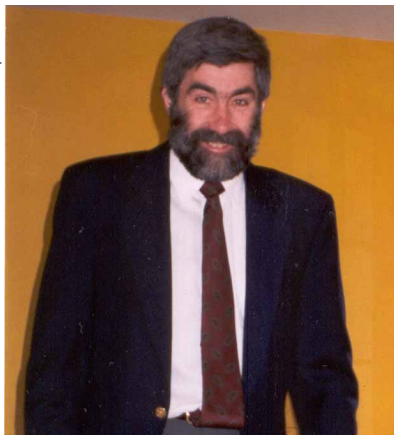
diversidade. Makela – hoje vive numa ilha deserta no Mar do Norte – era um deles. Descobriu uma espécie de barco para navegar na linfa dos camundongos: os háptens – substâncias químicas que restringem o número de anticorpos produzidos – que provocam resposta imunológica muito específica nesses animais.

Com Makela, usando háptens contra gerações sucessivas de tipos diferentes de camundongos, Thereza fez um achado espetacular, que lhe valeu a tese de doutoramento e mais quatro trabalhos nas grandes publicações internacionais: descobriu um marcador genético do sistema imunológico. A melhor comparação é com a história das ervilhas do monge Mendel. Mendel viu que no cruzamento de ervilhas de mesma cor resultavam ervilhas de cores diferentes. Thereza viu que dois camundongos diferentes tinham o mesmo anticorpo de resposta a um determinado hápten. No dois casos, a conclusão foi a mesma: um conjunto de genes era responsável pela qualidade observada; variando o gene, variava a cor; ou, variando o gene, variava a resposta imune.

Imunizados pelo hápten NP, os dois camundongos produziam um mesmo tipo de anticorpo. Um deles era preto, o C57bl/6, seu nome técnico. O outro era branco, Balb/c. No preto, os genes que expressavam aquele tipo de anticorpo eram recessivos, ou seja, praticamente não se expressavam nas linhagens puras. No branco, no entanto, eram dominantes. Haveria alguma forma de ativar a produção do anticorpo no camundongo preto? Ou seja: haveria uma forma de ativar uma resposta imunológica desejada num



Thereza: formada na USP e hoje em Boston; trabalhou no Japão, na Finlândia, na Alemanha e nos EUA



Speed: ele usa as transcrições do julgamento de Thereza em suas aulas, para mostrar como a estatística pode ser usada para construir provas

animal? Essa era já a questão na época, com evidentes implicações para as possibilidades de intervenção no sistema imune e o combate a doenças. Klaus Rajewski, que foi depois diretor do centro de pesquisa imunológica da Comunidade Européia, estava interessado no assunto em 1974 e convidou Thereza para trabalhar em seu laboratório em Colônia, na Alemanha. Lá ela desenvolveu os reagentes necessários para caracterizar o tipo de imunoglobulinas produzidas por esses animais. São meia centena de proteínas que formam uma espécie de *kit*, ainda hoje usado por pesquisadores de todo o mundo.

De Colônia, Thereza foi para Boston, em 1981. O artigo para a revista *Cell* foi uma espécie de continuação do estudo das respostas iguais do C57bl/6 e do Balb/c ao hápten NP. Embora planejada por David Baltimore, o trabalho feito no MIT em 1986 baseava-se nos 15 anos da experiência européia de Thereza. Camundongos do tipo C57bl tinham inserido dentro de si, já ao nascer, uma cópia extra rearranjada do gene da cadeia pesada mu, da resposta dominante do Balb/c ao hápten NP.

O animal não deveria expressar proteínas com aquele tipo de cadeia, porque o gene que a codificava era recessivo no seu código genético normal. Mas seu código genético tinha um gene externo inserido, e já rearranjado – já pronto para produzir exatamente o tal tipo de cadeia. O artigo com o transgênico era o terceiro de uma sé-

rie. Já se sabia que o animal usava o gene externo para produzir o anticorpo. Mas se sabia também que o repertório de expressão de imunoglobulinas de um animal transgênico era bagunçado. Thereza e Baltimore tinham observado, em artigo anterior escrito na mesma revista *Cell* um ano antes, que o gene rearranjado não inibia a utilização de outros genes. Outras proteínas eram também produzidas. “Quais?”, era a questão.

Mais especificamente: “estaria havendo alguma ativação do gene recessivo? A proteína estaria sendo feita também pelo gene endógeno do animal? De algum modo o transgene inserido estaria ‘falando’ com os genes internos, estimulando seu semelhante a se expressar?” Thereza e Baltimore tinham como diferenciar o gene endógeno do transgene. Vistos das dimensões da célula B, o mundo que produz o variadíssimo arsenal de imunoglobulinas, os anticorpos são como naves espaciais: imensos, com centenas de subestruturas, os aminoácidos. Embora ambos sejam capazes de identificar o hápten NP – ou seja, tenham a mesma garra que faz o acoplamento com o antígeno –, o anticorpo do Balb/c e do C57bl/6 tem uma pequena diferença na cadeia pesada, uns poucos aminoácidos distintos.

Thereza era uma campeã no manejo dos reagentes necessários para capturar essas diferenças sutis dentro do intrincado sistema imune do animal. Baltimore era o laureado descobridor dos mecanismos de funcionamento e da estrutura dessas moléculas. O artigo da *Cell* tinha tudo para ser um trabalho histórico. Acabou sendo o motivo para uma perseguição absurda.

De início, em processos ocorridos entre 1986 e 1990, logo depois da denúncia de irregularidade, o artigo foi analisado por especialistas da área. Três comitês de imunologistas – um da Escola de Medicina de Tufts, onde Thereza está atualmente empregada; outro do Massachusetts Institute of Technology (MIT), onde ela escreveu o artigo, junto com o prêmio Nobel David Baltimore, também desse instituto; e o terceiro do National Institutes of Health (NIH), órgão federal que supervisiona a pesquisa biomédica nos EUA – examinaram o artigo e concluíram que não havia fraude.

Por pressão do Subcomitê de Supervisão e Investigação do Congresso americano, chefiado na época pelo deputado John Dingell, a investigação tomou, no entanto, outro rumo. O Serviço Secreto do governo federal – normalmente encarregado apenas da segurança do Presidente, da defesa da moeda e dos documentos nacionais – foi chamado a intervir. A partir de 1990, com a criação de um órgão especial para policiar a pesquisa biomédica – de início Office for Scientific Integrity, depois rebatizado para ORI –, a investigação deu outra reviravolta. Em 1990, teriam sido descobertas, no artigo, provas estatísticas de fraude. Essas supostas provas, no entanto, ficaram totalmente desmoralizadas no julgamento de 1996, quando a defesa de Thereza conseguiu acesso ao material usado na acusação e convidou um estatístico da Califórnia, Terrence Speed, para analisar as tais “provas estatísticas”. Depois do julgamento, Speed ligou para os advogados de Thereza pedindo autorização para usar as transcrições do caso em um curso universitário. Achou o assunto tão emblemático, que resolveu transformar em lições o debate que travou no tribunal contra os estatísticos do ORI. No seu depoimento final, disse que, ao longo dos meses em que se dedicou ao caso, ficou muito preocupado com o método usado pela acusação para tentar condenar a brasileira. Descreveu esse método usando trechos de um dos livros usados pela própria acusação no tribunal, da seguinte forma: “Ele guarda marcada semelhança com o que se chama na estatística comercial de *data snooping*”, algo como farejamento de informações. “O método se desenvolve, eu diria, talvez não tão generosamente, nem precisamente como o ORI gostaria, por etapas. Uma investigação começa com suspeitas de algum tipo por alguém. Ela se concentra, nessa fase, em alguns dados que possam apoiar essas suspeitas. Depois, estudos estatísticos, testes, análises são projetados para testar essas suspeitas. A meu ver, nesse caso, os resultados são trabalhosos de modo a reforçar essas suspeitas. É isso exatamente o que é *data snooping*”. A polícia científica americana partiu da convicção de que a Dra. Imanishi-Kari era culpada e foi construir um crime para tentar condená-la. Felizmente, fracassou. ■