



Biossegurança e Vacinas da Dengue

Critérios de Biossegurança na análise de um candidato Vacinal

A dengue, hoje a mais importante doença viral transmitida por artrópodos, resulta da infecção por um dos sorotipos do vírus do dengue. Esses vírus, denominados dengue tipos 1, 2, 3 e 4, são transmitidos a um hospedeiro susceptível através da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* previamente infectada. O quadro clínico dessa doença varia desde apresentações assintomáticas até quadros graves caracterizados por hemorragia e choque circulatório e associados a alta letalidade, denominados febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD). Essas formas da doença estão, na maior parte das vezes, relacionadas com a infecção secundária causada por um sorotipo do vírus da dengue diferente daquele que causou a infecção primária. FHD e SCD são prevalentes em mais de 100 países e são uma ameaça à saúde de mais de 2,5 bilhões de pessoas, habitantes das regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. A incidência anual da dengue é estimada em torno de dezenas de milhões, com um número aproximado de 500.000 hospitalizações de casos de FHD/SCD. Em média, o índice de mortalidade desses casos é de 5%, com, aproximadamente, 24.000 óbitos por ano. No Brasil, somente neste ano, já foram notificados 213.932 casos de dengue, sendo que, até a 18ª semana epidemiológica, 50 casos foram caracterizados como FHD/SCD e resultaram em 8 óbitos.

A Organização Mundial da Saúde

(OMS) considera o controle e a prevenção da dengue uma das suas prioridades e, para atingir esse objetivo, adotou, em 1995, um programa estratégico mundial. Atualmente, o controle dessa doença baseia-se primariamente no controle do vetor, já que não existe ainda uma vacina licenciada para uso humano, apesar de intensa pesquisa nesse campo nos últimos 30 anos.

Vacinas para a dengue

As primeiras tentativas de produção de vacinas para os vírus da dengue iniciaram-se alguns anos após esses vírus terem sido isolados. Inicialmente, candidatos vacinais foram atenuados pela passagem seriada em cérebros de camundongos e se mostraram protetores contra os seus protótipos selvagens. Entretanto, proteção apenas contra um tipo de sorotipo não é suficiente devido à hipótese de que a infecção sequencial por um sorotipo diferente leve a uma doença mais grave. Desse modo, a vacina para o dengue deve ser tetravalente, isto é, proteger contra os 4 sorotipos. Assim, pesquisadores começaram a tentar produzir vacinas atenuadas para o dengue, em particular grupos de várias instituições americanas e da Mahidol University, na Tailândia. As cepas 45AZ5 PDK-27 (dengue-1), DEN-2 PR-159-S1 (dengue-2), CH53489 clone 24/28 (dengue-3) e 341750 Carib (dengue-4) foram desenvolvidas pelos grupos americanos enquanto que as cepas DEN-1 PDK-13, DEN-2 PDK-53, DEN-3 PGMK-30/F2 e DEN-4 PDK-48 foram desenvol-

Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Médico formado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Mestrado e Doutorado pela Yale University (USA).

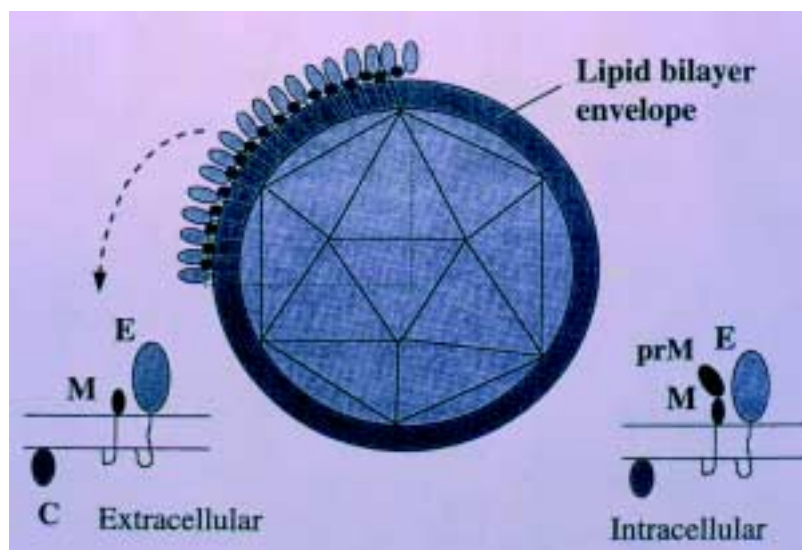
vidas na Tailândia, sob supervisão da OMS. Vários ensaios clínicos foram feitos com esses candidatos vacinais, quando foram conseguidos alguns resultados que garantiam a possibilidade dessas vacinas serem usadas, desde que os problemas de potência e imunogenicidade fossem resolvidos. Em 1993, foi firmado um acordo comercial entre a Mahidol University e a Pasteur Merieux Serums and Vaccines Company para otimizar a produção dessas vacinas para o dengue. No início deste ano, foi apresentado, no First Annual Conference on Vaccine Research em Washington, D.C., o resultado dos testes em voluntários humanos com esta vacina. A conclusão do trabalho foi que, apesar da maioria dos indivíduos testados terem apresentado soroconversão, interações entre os sorotipos virais resultando em viremia seletiva pelo dengue-3, podem afetar a infectividade e imunogenicidade da vacina tetravalente.

A produção de vacinas de vírus inativados tem sido pouco explorada na produção de vacinas para o dengue devido à característica de não apresentar grande imunogenicidade. Recentemente, Putnak e colaboradores tem investido nesse método de produção de candidatos vacinais através da passagem desses vírus em células Vero (rim de macaco verde africano) e FRhL-2 (pulmão fetal de macaco Rhesus) seguido por inativação em formalina a 0.05% e formalina seguida de radiação (7 mRads de fonte de cobalto). Entretanto, somente proteção parcial foi obtida com esta técnica o que a coloca em segundo plano em relação às demais, principalmente pelo fato de ser muito caro produzir esse tipo de vacina e pela pouca imunogenicidade.

Outra estratégia usada na produção de candidatos vacinais refere-se à purificação de proteínas nativas dos vírus da dengue por cromatogra-

fia líquida (HPLC). Os resultados aí também foram desapontadores e, associada ao custo de produção, essa estratégia tem sido abandonada.

Nos últimos anos, algum progresso no desenvolvimento de vacinas tem sido alcançado por meio do uso da tecnologia do DNA recombinante. As estratégias usadas foram as de produção de peptídeos sintéticos, vacinas de subunidades, vacinas de vírus recombinantes, vacinas derivadas de clones infecciosos de cDNA derivados de candidatos vacinais e vacinas de DNA. Deposita-se muita esperança nos dois últimos métodos. Um clone infeccioso de cDNA preparado a partir do candi-



dato vacinal DEN-2, PDK-53 está sendo usado para construir vírus quiméricos por meio da inserção dos genes da cápside viral, da pré-membrana e do envelope dos vírus dengue-1, 3, e 4 na estrutura genômica do DEN-2 PDK-53. Essas vacinas vêm sendo desenvolvidas com sucesso por um grupo do National Institutes of Health (NIH) e têm-se mostrado imunogênicas no modelo animal. Além disso, clone infeccioso de cDNA do vírus da febre amarela pode ser usado para os mesmos fins. As vacinas de DNA podem representar uma solução, pois elas podem ser usadas para imunização contra um sorotipo específico de dengue, sem o inconveniente de induzir a resposta imune exacerbada responsável pelas infecções graves do dengue. Kochel e colaboradores produziram um candidato vacinal para o dengue-2 e demonstraram a presença de anticorpos neutralizantes para esse vírus em ca-

mundongos. Outros candidatos vacinais preparados por engenharia genética são as vacinas de subunidades e vírus recombinantes que expressem proteínas dos vírus da dengue. A produção de vacinas de subunidades em baculovírus tem tido resultados conflitantes pois alguns grupos têm encontrado proteção total em camundongos, enquanto outros encontram apenas proteção parcial. Com vírus recombinantes, principalmente com o vírus da vaccínia, esses resultados não têm sido diferentes, apesar desses vírus recombinantes possuírem a reputação de induzirem melhor resposta imune do que os outros vetores

recombinantes, tais como bactérias, por exemplo, a *Salmonella typhimurium*.

Biossegurança e vacinas

Desde que a vacina para a dengue seja a única chance de realmente controlar essa doença, intensas pesquisas nessa área poderão resultar na produção de candidatos vacinais. As normas para liberação de uma vacina deve cobrir todas as fases de produção de uma vacina, isto é, a fase de desenvolvimento, de ensaios clínicos,

registro nos órgãos competentes e vigilância pós-liberação. Antes da fase de investigação clínica, deve-se investir na segurança do laboratório em que a pesquisa está sendo desenvolvida a fim de se proteger as pessoas que estão envolvidas na pesquisa e que o meio ambiente não seja afetado pelos produtos secundários resultantes dessa pesquisa. Para tanto, as condições de segurança dos laboratórios devem ser otimizadas, em especial com a manipulação dos vírus e o descarte do material. A infraestrutura de biotério é de extrema importância, pois se a pesquisa for realizada em áreas endêmicas para a dengue, existe a possibilidade de contaminação dos animais usados em pesquisa por mosquitos infectados ou da contaminação de mosquitos pelo candidato vacinal. Além disso, é necessário certificar-se de que os materiais usados na produção das vaci-

nas sejam puros e seguros, e que, ao mesmo tempo, não comprometam a potência da vacina. Testes em animais, inclusive em primatas não-humanos, devem ser exaustivamente realizados para garantir que a mesma não é tóxica, portanto é segura, potente e eficaz para uso em humanos. Após a avaliação da eficácia dessa vacina no laboratório, os critérios de biossegurança devem ser aplicados na investigação clínica.

A investigação clínica para validação da vacina como imunobiológico geralmente se faz em três fases: os ensaios clínicos de fase I, II e III. Na fase I, o produto é administrado para um pequeno número de voluntários e visa a determinar a atividade biológica do produto, sua potência e a sua segurança. Nesse caso, um candidato vacinal para a dengue deverá induzir a formação de anticorpos neutralizantes e, para alcançar esse objetivo, o candidato vacinal deve ser administrado em pequenas doses e ser isento ou com poucos efeitos colaterais. Ainda nessa fase, pode-se certificar de que o candidato vacinal não persiste no organismo (latência) e que pode ser administrado com segurança a imunossuprimidos e imunocomprometidos. Ensaios de fase II destinam-se a confirmar os achados dos ensaios de fase I, em particular a eficácia do produto em produzir a sua atividade farmacológica e fisiológica. No caso das vacinas da dengue, essas deverão induzir resposta imune que confira proteção contra os quatro sorotipos de vírus da dengue semelhante à resposta induzida pelos próprios agentes. Nessa fase, o vírus selvagem pode ser administrado aos voluntários que foram vacinados ou podem ser usados voluntários de área endêmica e verifica-se a capacidade protetora da vacina. Alguns efeitos colaterais mais raros podem ficar aparentes nessa fase. Devido ao maior número de voluntários usados, pode-se determinar, nessa fase, se a “infecção” pela vacinação ocorre somente na população alvo, se o candidato vacinal é contagioso e se induz fenômenos imunológicos que possam ser associados ao desenvolvimento de doença auto-imune. Se o candidato vacinal é um vírus recombinante, deve-se avaliar se não ocorreu mudança de especificidade celular ou aumento da virulência. Na fase III, os ensaios clínicos são

realizados “no campo”, com um grande número de pessoas e devem incluir populações com características epidemiológicas bem estudadas. A vigilância pós-liberação deve ser implementada e documentada. Somente assim, eficácia e segurança a longo prazo podem ser determinadas. Apenas com estudos a longo prazo é que se poderá concluir que o candidato vacinal não é tumorigênico ou não ocorre integração no genoma do hospedeiro. Nessa fase, por meio de estudos controlados, outros aspectos importantes na discussão de critérios de biossegurança poderão ser avaliados. Entre eles estão a capacidade do candidato vacinal infectar outras espécies, incluindo os vetores da dengue, de sobreviver na natureza, de ser disseminado no meio-ambiente e, finalmente, do grau de segurança desse candidato vacinal a longo prazo. Dessa fase sairão os resultados que serão analisados em relação ao risco da liberação de uma vacina para uso humano e o benefício a ser alcançado. Como exemplo, os efeitos colaterais do vírus da vaccínia não foram desprezíveis durante a campanha de erradicação da varíola, porém a erradicação dessa doença livrou a humanidade de um dos seus maiores flagelos. Do mesmo modo, as vacinas contra a poliomielite e o sarampo não são inócuas, mas prestam um benefício imensurável às pessoas vacinadas. Quanto à persistência na natureza, é impossível prever o resultado da liberação de um candidato vacinal no meio-ambiente. O vírus da vaccínia é, até hoje, excretado por búfalos, na Índia. Isso só ocorre porque o vírus da vaccínia tem a capacidade de infectar outras espécies que não aquela visada para a vacinação. Desse modo, será difícil ocorrer a liberação de um vírus recombinante preparado a partir de um vírus da vaccínia para uso vacinal. Por outro lado, se a especificidade do candidato vacinal para a espécie humana for alta e os efeitos da infecção aguda pouco importantes, a persistência na natureza pode auxiliar na imunização de susceptíveis

Assim, a avaliação de critérios de biossegurança na liberação de um candidato vacinal é complicada pela necessidade de estudos a longo prazo, porém um dos critérios mais importantes é a avaliação de risco e

benefício. As vacinas de vírus atenuados multivalentes, como é o caso da vacina para a dengue, podem apresentar a replicação preferencial de um sorotipo viral em detrimento dos outros. Além disso, por serem atenuadas, e portanto, vacinas de vírus vivos, existe a possibilidade da reversão de um deles à cepa virulenta, aumentando a possibilidade de causar doença clínica após a inoculação da vacina. As vacinas de vírus quiméricos funcionariam como vacinas de vírus atenuados e, portanto, com os mesmos problemas mencionados anteriormente para essas vacinas. Adicionalmente, como ocorre a produção de um vírus previamente inexistente, não se pode prever o impacto desse novo vírus na natureza e o resultado das suas infecções em seres humanos. Desde que vacinas de DNA estão sendo consideradas uma alternativa promissora para o desenvolvimento de vacinas, a maior preocupação é a possibilidade de integração desses DNAs no genoma celular. Estudos sobre esse tema têm mostrado que a injeção de 200 mL de DNA, o que corresponde a 3×10^{13} moléculas de DNA, representa uma frequência de integração 10.000 vezes inferior a evento oncogênico, o que é um evento extremamente raro. Assim, se um candidato vacinal apresentasse um efeito adverso indesejado a cada 100.000 vacinações, este seria considerado um alto índice de efeitos adversos. Porém, se analisarmos o fato de que já foram notificados mais de 200.000 casos de dengue este ano no Brasil e que houve 50 casos de dengue hemorrágico nesse período, resultando em 8 óbitos, o benefício da vacinação é óbvio. Desse modo, é importante determinar os critérios de biossegurança para que se possa avaliar um candidato vacinal na sua totalidade, mas, é claro, que os estudos a longo prazo são aqueles que nos darão as maiores informações sobre a segurança e o benefício do uso desses imunobiológicos. Desse modo, na eventualidade de se produzir uma vacina para dengue, esta deverá passar por uma bateria imensa de testes para que seja cogitada a sua aprovação para uso humano. Infelizmente, apesar dos esforços e da necessidade para controle dessa doença, vacinas para a dengue não estarão disponíveis para uso humano em um futuro próximo. 