



# Vacina para Dengue

Entrevista concedida a  
Evanildo da Silveira

As perspectivas de uma vacina contra o vírus da Dengue com a tecnologia do DNA recombinante

**T**odos os anos, algo entre 50 e 100 milhões de pessoas no mundo contraem algum dos quatro tipos de dengue. Calcula-se que cerca de dois bilhões de pessoas vivem em áreas de risco da doença. Apenas em 1995, foram notificados, somente nas três Américas, 250 mil casos de dengue, sete mil da forma grave da doença (hemorrágica).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, hoje as áreas de maior risco são as Américas Central e do Sul (exceto Argentina, Chile e Paraguai), México, África, Austrália, Caribe (com exceção de Cuba e Ilhas Cayman), China, Índia e Sudeste Asiático. Embora nos Estados Unidos a dengue seja rara, houve registros de alguns casos no Texas, em 1995.

No Brasil, a doença foi considerada erradicada já na década de 30 do século passado. Na época, o combate à febre amarela levou praticamente à extinção do mosquito transmissor da dengue, o *Aedes aegypti*, vetor das duas moléstias. No entanto, em 1981, a doença voltou a fazer vítimas, principalmente na Região Norte. A partir de então, a dengue começou a se alastrar para outras regiões do país, notadamente as mais quentes.

As primeiras epidemias, depois do seu ressurgimento, foram registradas no Rio de Janeiro, uma em 1986-87, com cerca de 90 mil casos, e outra em 1990-91, com 100 mil. Daí em diante, o número de vítimas só fez crescer. Em 1998, foram registrados, segundo o Ministério da Saúde, mais de 570 mil. Campanhas de conscientização da população e o trabalho do governo no combate ao mosquito transmissor reduziram o número de vítimas para 210 mil, em 1999. No entanto, a queda do número de casos foi passageira, pois, desde então, o número de vítimas voltou a crescer: 240 mil em 2000 e 390.765 casos em 2001. Neste ano, só em janeiro e fevereiro, foram registrados 190.389 casos em todo o país, segundo dados da Funasa. Além disso, o problema se agravou recentemente por causa da introdução de mais um sorotipo de dengue no Brasil. Antes, só havia a dengue tipo 1 e 2, agora o 3 também chegou.

A dengue é uma doença infecciosa causada por um *arbovírus*, da classe dos flavivírus (existem quatro tipos diferentes de vírus do *dengue*- 1, 2, 3 e 4), que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, como o Brasil. É transmitida principalmente por duas espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. As epidemias, que são mais comuns no verão, estão, atualmente, se expandindo rapidamente. A previsão para os próximos anos é que aumentem em todo o planeta, principalmente nos trópicos.

Apesar do esforço de cientistas de todo o mundo, ainda não existem vacinas contra a doença. A forma mais eficaz de evitá-la, por enquanto, é combater os mosquitos transmisso-

res. A infecção causada por qualquer um dos quatro tipos do vírus da dengue produz manifestações semelhantes. Em mais de 95% dos casos, os sintomas são desconforto, febre alta, dor de cabeça e no corpo e, às vezes, vômitos.

Também podem aparecer, três ou quatro dias após o início dos primeiros sintomas, coceira (prurido) e manchas vermelhas na pele, parecidas com as do sarampo ou rubéola. Além disso, é comum aparecer pequenos sangramentos no nariz e nas gengivas. A dengue, entretanto, raramente coloca em risco a vida da pessoa. A maioria das vítimas começa a melhorar após quatro ou cinco dias e recupera-se totalmente em cerca de dez dias.

O médico pernambucano Ernesto Marques, doutor em Farmacologia e Ciências Moleculares pela prestigiada universidade norte-americana *The Johns Hopkins University School of Medicine (JHU/SOM)*, de Baltimore, onde trabalha, tem um interesse pessoal em descobrir uma vacina contra a dengue. Em 1998, no Recife, viu sua mãe, na época com 60 anos, contrair dengue. Marques imaginou, então, que o seu interesse por vacinas de DNA, que já vinha desde 1995, pudesse ajudar a combater uma doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo.

Ele resolveu aproveitar sua experiência com a chamada tecnologia LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein), em vacinas de DNA, que havia sido descoberta na JHU/SOM. “Meu primeiro projeto com essa tecnologia foi com HIV”, lembra. “Mas não estávamos progredindo muito rápido. Tínhamos alguns problemas que não estávamos conseguindo resolver com as nossas vacinas. Pensando sobre o assunto, achei que a dengue era um bom modelo para aplicar a tecnologia LAMP. Também imaginei que teria mais chance de encontrar uma vacina contra dengue do que contra HIV/AIDS.”

Com sua equipe, ele começou, então, a trabalhar com dengue em colaboração com a Marinha Americana. “Foi evidente, desde o início, que estávamos tendo sucesso e progredíamos rápido”, conta. “Em dezembro 2000, fizemos uma descoberta que nos permitiu avançar muito em nosso programa de HIV e resolvemos, então, diminuir um pouco os nossos esforços com as pesquisas contra a dengue. Agora estamos trabalhando de novo, no entanto, com o máximo da



nossa capacidade nos dois projetos.”

Graduado em medicina em 1993, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Marques iniciou a carreira científica no Brasil, trabalhando com Biosensores para Vitamina C e Glicose. Em 1994, ele ingressou no programa de pós-graduação da JHU/SOM e em 1999, concluiu o doutorado. “Fui imediatamente contratado para o corpo docente da JHU/SOM pelo Dr. Thomas August, na época chefe do departamento de Farmacologia”, orgulha-se. “Hoje, tenho cursos avançados em Biologia Molecular, Bioquímica, Biofísica, Genética, Biologia Celular, Imunologia, Virologia, Bioinformática entre outros.”

Sua tese de doutorado envolveu a caracterização bioquímica e molecular da enzima Fucosiltransferase do *Schistosoma mansoni* e o desenvolvimento de inibidores para essa enzima, com o objetivo de criar uma nova droga para tratamento da esquistossomose. Publicou vários trabalhos nesse campo.

Para que ele falasse sobre suas pesquisas com a vacina contra a dengue, a tecnologia LAMP e suas perspectivas, a revista **Biociência, Ciência & Desenvolvimento** entrevistou o médico Ernesto Marques Jr., M.D./Ph.D, pesquisador associado do Departamento de Farmacologia e Ciências Moleculares, da Johns Hopkins University School of Medicine.

### **BC&D - Desde quando o senhor está pesquisando uma vacina para a dengue?**

**Ernesto Marques** - Desde o final de 1998, começo de 1999

### **BC&D - Como surgiu o seu interesse por uma vacina para essa doença?**

**Ernesto Marques** - Bem, a idéia surgiu principalmente por consequência da epidemia que está ocorrendo no Brasil, inclusive até alguns familiares meus a tiveram também.

### **BC&D - O senhor poderia explicar o que é a tecnologia “Naked DNA”?**

**Ernesto Marques** - É uma resposta longa, mas, de forma bastante simplificada, eu diria que o termo “Naked DNA” surgiu no início dos anos 90. Ele refere-se ao uso de DNA puro na forma de plasmídeos (vetores de expressão de proteínas) em células de animais, sem o uso de nenhum agente para revestir o DNA - por

isso chamado de Naked (nu, despido). A grande surpresa foi a capacidade destes plasmídeos entrarem dentro das células dos animais vivos e produzirem a proteína codificada por eles (plasmídeos) sem a ajuda de um vetor. Como vacinas, de um modo geral, funcionam induzindo uma resposta imunológica contra antígenos - que são proteínas na maioria das vezes - se pensou, imediatamente, em aplicar esta tecnologia para desenvolvê-las. Hoje, com as tecnologias de engenharia genética é fácil construir plasmídeos capazes de sintetizar a proteína (antígeno) que se deseja. Um dos grandes contribuidores para o avanço das tecnologias de engenharia genética foi o Dr. Daniel Natans, nosso professor aqui na JHU e laureado com o prêmio Nobel de Medicina, em 1978, devido às suas descobertas de enzimas de restrição, que foram a base da engenharia genética.

**"O que se espera de uma vacina contra dengue é que ela seja capaz de prevenir a infecção dos quatro sorotipos dos vírus, não produza efeitos colaterais, seja muito segura, não aumente o risco da dengue hemorrágica e tenha um baixo custo."**

### **BC&D - O senhor poderia explicar a estratégia “LAMP”? O que ela significa? Como funciona?**

**Ernesto Marques** - LAMP é a abreviação de “Lysosome Associated Membrane Protein”. LAMP é uma proteína das nossas células que se localiza especificamente nos lisossomos, que são organelas celulares especializadas na digestão celular. A “estratégia LAMP”, se refere ao uso de uma pequena porção da proteína LAMP, que é responsável pela localização da mesma nos lisossomos, é um “sinal de tráfego celular”. Nós utilizamos este “sinal de tráfego celular” da proteína LAMP e o colocamos em outras proteínas para fazer com que elas também se dirijam aos lisossomos. No caso da vacina para dengue, colocamos o sinal LAMP na proteína do envelope do vírus da dengue e a fizemos se dirigir para o lisossomo. A vantagem de se colocar proteínas antigênicas direto no lisossomo é que, em certas células especializa-

das do sistema imune (células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas), os lisossomos são o centro de processamento dos antígenos. Ou seja, o direcionamento ao lisossomo torna os antígenos muito mais visíveis ao sistema imune e, portanto, às vacinas mais eficientes.

### **BC&D - O senhor poderia explicar o que é exatamente o “sinal de tráfego celular” da proteína LAMP? O que é o tráfego celular”?**

**Ernesto Marques** - As células possuem vários compartimentos bem organizados que têm funções bem específicas e são chamados de organelas. As células transportam materiais entre estes compartimentos para serem processados. É como nós fazemos na indústria, por exemplo. Alguém coleta o minério de ferro e põe no caminhão para ser levado à usina siderúrgica. Na usina, eles fabricam o aço e o mandam para a indústria automobilística. E assim por diante. Quando o material é transportado de um local para o outro, você deve pôr o endereço do destinatário. As células têm sistemas similares. Os sinais de tráfego celulares são indicadores que determinam este endereçamento dentro da célula. O sinal celular da LAMP, portanto, é o sinal que determina que LAMP vai ser transportada ao compartimento endossomo/lisossomo (endossomo é organela, mais ou menos como o lisossomo).

### **BC&D - Por que o senhor achou que dengue era um bom modelo para aplicar a tecnologia LAMP?**

**Ernesto Marques** - Por várias razões. Uma é que, quando uma pessoa se infecta com dengue, geralmente se cura e não pega mais a dengue do mesmo sorotipo, só de outro. O que significa que a pessoa se torna imune. Isto não acontece com outras doenças, como é o caso de HIV. Outra razão, é que se sabe quais são os mecanismos imunológicos que tornam a pessoa resistente ao vírus e se tem maneiras de testar a vacina em animais e saber se ela dá proteção ou não. No caso específico do uso de LAMP, a vantagem é que o antígeno principal da dengue é uma proteína de membrana como LAMP e o tráfego celular funciona sem complicações.

### **BC&D - Como o sinal de tráfego celu-**

## **lar é colocado em outras proteínas?**

**Ernesto Marques** - O sinal de tráfego celular de LAMP se constitui em uma seqüência específica de aminoácidos, que determina o endereçamento celular. Por técnicas de biologia molecular e engenharia genética nós podemos construir proteínas quiméricas, compostas por partes de várias proteínas diferentes, colocando nestas quimeras o sinal que as endereça ao endossomo/lisossomo. No caso da vacina contra a dengue fizemos uma quimera com uma parte da proteína do envelope do vírus da dengue e uma outra parte com o sinal de tráfego celular de LAMP, para direcionar ao endossomo/lisossomo.

## **BC&D - O que significa “alterar o tráfego do envelope da dengue”?**

**Ernesto Marques** - A proteína “envelope” normalmente não é levada ao lisossomo, mas quando nós colocamos o sinal LAMP ela passa a ser. E isto é que leva a vacina envelope/LAMP quimera a ser mais imunogênica.

## **BC&D - O que vem a ser o “envelope da dengue”?**

**Ernesto Marques** - Alguns vírus são revestidos por uma membrana, como é o vírus da dengue, e esta membrana, junto com as proteínas que estão nela, é chamada de envelope. Estes vírus, para serem capazes de penetrar e infectar outras células, geralmente precisam se reconhecer e fundir-se a células específicas. Isto é mediado através das proteínas virais específicas que se localizam no envelope. O vírus da dengue só tem uma proteína (viral) no envelope (que é conhecida como envelope, que contém um fragmento chamado pré-membrana) mas outros vírus possuem mais. A existência destas glico-proteínas virais de membrana foi inicialmente identificada por Dr. Thomas August and Dra. Mette Strand, que foram orientadores da minha tese no doutorado.

## **BC&D - Sua vacina é o que se pode chamar de “vacina gênica”?**

**Ernesto Marques** - Sim, eu diria que o uso de DNA ou RNA como vacina é o que caracteriza uma vacina gênica. O uso do DNA recombinante abre um leque infinito de possibilidades. Neste caso, nós usamos uma porção do LAMP para alterar o tráfego do envelope da

dengue. Mas existem outras coisas que podemos fazer.

## **BC&D - Por exemplo?**

**Ernesto Marques** - Associar moléculas que são estimuladoras do sistema imunológico como, GM-CSF ou IL-2, epítopos específicos, sinais do sistema imune nativo etc.

## **BC&D - Há o risco desse DNA, usado nas vacinas, incorporar-se ao genoma das pessoas vacinadas e alterá-lo?**

**Ernesto Marques** - Isto tem sido investigado exaustivamente e até agora não se conseguiu nenhuma evidência de que isto esteja ocorrendo.

## **BC&D - Por que essa certeza?**

**Ernesto Marques** - Vários testes de Vacinas de DNA já foram feitos, em diversas espécies de animais e também em humanos, e após algumas semanas de vacinação, o DNA da vacina não foi mais encontrado nos tecidos do vacinados por nenhuma das técnicas mais sensíveis que conhecemos.

## **BC&D - A vacina que o senhor desenvolve usa vírus atenuado ou vivo?**

**Ernesto Marques** - Ela não usa vírus atenuado ou vivo. Os vírus, são agentes vivos, que infectam as células, se replicam e infectam mais células. Os vírus também tem o seu material genético (RNA ou DNA) e suas próprias proteínas. O plasmídeo, “Naked DNA”, não carrega consigo nenhuma proteína e só tem uma pequena fração do material genético do vírus. Não é capaz de se reproduzir nas células humanas ou transfectar novas células.

## **BC&D - Quais são as etapas do desenvolvimento dessa vacina?**

**Ernesto Marques** - Desta e de quaisquer outras vacinas, o processo se inicia com um descoberta científica no laboratório. Em seguida, faz-se uma série de testes em animais, que se chamam estudos pré-clínicos. Se tudo correr bem, começam a ser feitos os estudos em pessoas. Há basicamente quatro fases: I – inicialmente, com poucas pessoas, se quer saber, principalmente, a toxicidade e qual a maior dose tolerada.

II - já com um grupo maior, tenta-se saber os efeitos que a vacina causa,

quais os tipos de respostas imunes, etc. Às vezes, fazem-se vários testes nesta fase.

III – usa-se um grande grupo de pessoas. A principal questão é se a vacina realmente está funcionando ou não, e, também, se é segura. Caso sejam bem sucedidas todas as etapas, os órgãos reguladores dão a autorização do uso da vacina.

IV – é quando se fazem estudos clínicos, para aperfeiçoar o uso da vacina.

Na minha opinião, a questão mais difícil com relação à vacina de dengue é se a vacina pode ou não aumentar o risco da dengue hemorrágica e, caso isto realmente ocorra, em que situações este risco aumentado aparece.

## **BC&D - Quais os resultados obtidos até agora?**

**Ernesto Marques** - Nós ainda estamos na fase pré-clínica. O que sabemos com certeza, até agora, é que a nossa vacina de DNA dengue/LAMP dá uma resposta de anticorpos que neutraliza o vírus, evitando que ele infecte as células, muito maior do que qualquer outras vacinas de DNA feitas contra dengue já existentes. Além disso, essa produção de anticorpos se mantém elevada por um longo tempo.

## **BC&D - Quais as perspectivas da vacina?**

**Ernesto Marques** - O que se espera de uma vacina contra dengue é que ela seja capaz de prevenir a infecção dos quatro sorotipos dos vírus, não produza efeitos colaterais, seja muito segura, não aumente o risco da dengue hemorrágica e tenha um baixo custo. Existem boas candidatas para preencher esses requisitos. A nossa é uma delas. Existem as de vírus atenuados, entre as quais a mais avançada é uma que foi desenvolvida na Tailândia e hoje a empresa Aventis Pasteur está desenvolvendo. A estratégia dessa vacina apresenta algumas dificuldades, no entanto. Uma delas é o nível de reações adversas que esta vacina apresenta. Algumas pessoas podem se sentir mal por causa dela. Outra dificuldade é fazer uma formulação que seja eficaz para os quatro sorotipos, em todas as pessoas de uma área endêmica. Existem ainda, as quimeras virais, que combinam o vírus atenuado da vacina de febre amarela com o envelope da dengue. Esta estratégia talvez não tenha o primeiro problema da anterior, mas, pro-

vavelmente, terá o segundo. Existem outros tipos de quimeras virais. E entre as vacinas de DNA, a maior dificuldade delas é que elas não são fortes o suficiente como as virais e também pelo fato de ser uma tecnologia muito nova, com a qual não se tem tanta experiência quanto com os outros tipos de vacinas. Nós achamos que melhoramos muito a questão da potência com o uso do LAMP. As vacinas de DNA são mais estáveis e, potencialmente, mais seguras do que as virais. Além de poderem ser mais baratas e não precisarem de refrigeração.

### **BC&D - Quais são, enfim, as vacinas para a dengue mais promissoras?**

**Ernesto Marques** - Existem, como já disse, várias vacinas candidatas que têm boa chance de ser bem sucedidas. Nenhuma delas comprovou ainda que são seguras e eficazes em populações endêmicas. As mais avançadas são as de vírus atenuado, existem duas que eu conheço; as quimeras virais, que são o vírus vivo atenuado da febre amarela contendo partes do vírus da dengue e também a quimera do dengue-4 atenuado por biologia molecular com partes dos outros sorotipos de dengue, que já fez o seu primeiro estudo em humanos no ano passado aqui na Hopkins; e entre as de DNA a nossa é a mais promissora. Existem também as de proteína recombinante, mas aparentemente os resultados não estão sendo muito encorajadores com estas candidatas.

### **BC&D - Em quanto tempo sua vacina poderá estar disponível para ser usada pela população?**

**Ernesto Marques** - Eu não sei precisamente, depende de muitos fatores como a quantidade de recursos disponíveis, dos problemas encontrados, etc. Eu posso dar uma estimativa me baseando no tempo que outros têm levado para passar pelas etapas que ainda tenho que passar, que seria em torno de 6 a 8 anos. Porém, o que é mais importante é que a vacina seja segura para as pessoas. Eu sei que a dengue é um problema grave e precisa de uma vacina o mais breve possível, porém não valeria a pena colocar a população em risco com uma vacina sem ter certeza absoluta se ela é segura. Por enquanto, o melhor método para combater a dengue ainda é o controle do mosquito, que precisa de muito apoio da população e da direção do

governo. Também precisamos ser pacientes e determinados pois mesmo com todo apoio ainda vão ser levados alguns anos para controlar o mosquito.

### **BC&D - Quem mais está envolvido nessa pesquisa e quem a financia?**

**Ernesto Marques** - A Marinha Americana com o grupo do Dr. Curtis Hayes, diretor da divisão de pesquisa de doenças infecciosas do Naval Medical Research Center (NMRC), e nós na JHU/SOM (Eu, Tom August, Ihd C. Leão, Priya Chichlikar, Luciana Arruda-Hinds e BJ Hart). O financiamento no nosso lado vem do NIH e de uma firma chamada Aarmedis. No lado da Marinha, vem do departamento de defesa.

"As vacinas de DNA são mais estáveis e, potencialmente, mais seguras do que as virais."

### **BC&D - Por que a Marinha Americana está financiando a pesquisa? Qual o interesse dela numa vacina contra a dengue?**

**Ernesto Marques** - O departamento de defesa tem vários papéis, e a segurança nacional também depende da saúde da população. A Marinha americana tem uma grande tradição de desenvolvimento de vacinas, entre outros, alguns exemplos são a da hepatite A, a da malária e a da dengue também; inclusive, os primeiros isolados do vírus da dengue foram feitos pela marinha americana. Recentemente, houve alguns surtos de dengue na região sudoeste dos Estados Unidos, no Texas, e o mosquito vetor se distribuiu por toda a região leste do país até o Maine, o que possibilita que a doença se espalhe. Por isto existe o interesse. Inclusive o vírus West Nile, que apareceu em Nova York, é um parente próximo da Dengue e também é transmitido pelo mesmo mosquito.

### **BC&D - Porque o vírus West Nile pode ser considerado um parente próximo do vírus da dengue?**

**Ernesto Marques** - O West Nile também

é um arbovírus e flavivírus. Possui as mesmas características, como envelope, +RNA, e codifica os mesmos tipos de proteínas, ou muito parecidas.

### **BC&D - Quanto já foi e quanto será investido nas pesquisas dessa vacina?**

**Ernesto Marques** - No nosso grupo, algo em torno de U\$1.5 milhão, e eu acredito que, após todas as etapas de estudos clínicos, o total investido deve ser próximo a U\$ 15.0 milhões.

### **BC&D - Para deixar bem claro, e resumindo, como funciona sua vacina?**

**Ernesto Marques** - Para ser mais didático, vou enumerar os passos:

a – Constrói-se, por engenharia genética, um plasmídeo “DNA”, que carrega consigo uma pequena fração do material genético do vírus da dengue.

b – O DNA é quem codifica a proteína, ou seja, é quem determina como a proteína vai ser feita. Então, por engenharia genética, nós criamos um código genético com pedaços dos genes do envelope e do sinal da LAMP, colados um no outro no DNA. Este novo código de DNA produzirá a proteína quimérica do envelope com o sinal LAMP.

c – Esse plasmídeo “DNA” é capaz de produzir, dentro das células humanas, proteínas antigênicas do vírus da dengue capazes, por sua vez, de provocar uma reação imunológica do organismo humano (quer dizer, provoca a produção de anticorpos contra o vírus da dengue).

d – Para otimizar esse processo, usa-se a “estratégia LAMP”.

e – Essa pequena porção do LAMP, colada no envelope da dengue (Explicando: o plasmídeo não se dirige ao lisossomo, só a proteína codificada por ele) o dirige para o compartimento especializado para processamento de antígenos chamado MIIC, que é uma espécie de lisossomo.

f – Dentro do compartimento MIIC, há a produção de antígenos de classe II.

g – Essa maior produção de antígenos de classe II gera, por sua vez, uma quantidade muito maior de produção de anticorpos.

h – Com isso, aumenta-se a eficiência da vacina. A pessoa torna-se imune à doença, pois a dengue é semelhante ao sarampo: só dá uma vez. Isto é verdade para um mesmo sorotipo, por isto se faz a vacina com os envelopes dos quatro sorotipos da dengue para proteger contra todos os quatro.

