



Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

VACINA GÊNICA

ANDRÉIA BORGES PEREIRA

Brasília - 2003

Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Licenciatura em Biologia

VACINA GÊNICA

ANDRÉIA BORGES PEREIRA

Monografia apresentada como requisito
para a conclusão do curso de Biologia do
Centro Universitário de Brasília.

Orientação: Adrienne de Paiva Fernandes (UniCEUB)

Brasília – 2º semestre de 2003

DEDICATÓRIA

Dedico não somente essa monografia, mas a minha vida, tudo o que sou, tudo o que tenho a Deus, Aquele que sempre andou ao meu lado e nos momentos difíceis me carregou em seus braços para que eu jamais caísse e desistisse.

Dedico em especial aos meus pais, José Maria Pereira e Leonilda Rodrigues Borges Pereira, que investiram em mim com todo amor e dedicação, acreditando sempre na minha vitória.

Com carinho ao meu único irmão Fernando Borges Pereira.

E com todo meu amor ao Marcelo da Silva Campos que esteve presente na minha vida há sete anos e se tornou parte de mim.

Obrigada, amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Jesus Cristo, meu salvador; ao José Maria Pereira e a Leonilda Rodrigues Borges Pereira, meus pais; ao Fernando Borges pereira, meu irmão; ao Marcelo da Silva Campos, meu amor.

Agradeço as minhas amigas Fernanda Scofield Berbet França e Cláudia Alves Gonçalves Borges, as quais estiveram ao meu lado durante toda a caminhada tornando-a mais agradável. Obrigada, espero que esta não seja a única e última estrada que pegaremos juntas!!!

Agradeço a Adrienne de Paiva Fernandes, minha orientadora, que investiu seu tempo e dedicação nessa última etapa do curso. Muito obrigada!!!

Sem esquecer de agradecer também as outras companheiras e a todos os professores do UniCEUB, em especial ao Marcelo Ximenes, Cláudio, Betinha e Daniel.

RESUMO

A Vacina Gênica consta em inserir um gene que codifica uma proteína antigênica de um patógeno no núcleo da célula do hospedeiro com o auxílio de um vetor - DNA plasmidiano - com intuito de induzir em seu organismo uma resposta imune, a qual envolve tanto uma imunidade celular quanto uma imunidade humoral, e ainda uma produção de memória imunológica. Esse DNA plasmidiano pode ser introduzido no indivíduo por duas vias principais de administração: intramuscularmente ou intradermicamente. Essa vacina, ainda em fase de experimentação, oferece uma nova metodologia de imunização que pode prevenir doenças que não dispõem de uma prevenção por outras técnicas convencionais de vacinação, como é o caso do câncer e da AIDS.

Palavras-chave: Imunização, Tecnologia do DNA recombinante, DNA plasmidiano, Resposta imunológica, Doenças infecciosas.

SUMÁRIO

1. Introdução	07
2. Histórico	09
2.1. A descoberta da vacina	09
2.2. Os progressos da vacina	10
2.3. A vacina gênica	11
2.4. Pesquisas realizadas com a vacina gênica	11
3. Fabricação da vacina gênica	12
3.1. Extração do DNA	12
3.2. Purificação do DNA	13
3.2.1. Fragmentação do DNA	13
3.2.2. Separação dos fragmentos de DNA	14
3.3. Recombinação gênica	15
3.4. Transformação bacteriana	18
3.5. Amplificação/ Clonagem	19
3.6. Triagem	19
3.7. Isolamento	19
4. Vias de administração	20
4.1. Via de administração intramuscular	20
4.2. Via de administração intradérmica	21
4.3. Vantagens e desvantagens das vias de administração	23
5. Resposta imunológica (mecanismo de ação da vacina gênica)	23
5.1. Resposta imune celular	24
5.2. Resposta imune humoral	26
5.3. Relação da via de administração com a resposta imunológica	27
6. Vantagens e desvantagens da vacina gênica	29
6.1. Vantagens	29
6.2. Desvantagens	30
7. Conclusão	30
8. Bibliografia	31

1. INTRODUÇÃO

A vacina é uma técnica empregada para induzir no hospedeiro imunidade contra um determinado patógeno, pelo fato de provocar em seu organismo uma resposta imune com formação de memória imunológica, assim o indivíduo estará prevenido de desenvolver a doença quando ele entrar em contato com o patógeno. As vacinas são elaboradas com microrganismos, parte deles ou o produto destes modificado, com o intuito de induzir o tipo correto de imunidade. A descoberta da vacina deu-se principalmente em decorrência da intensa busca de cura contra o terror das epidemias que assolaram a humanidade a mais de cem anos atrás, trazendo prejuízos na agricultura e na veterinária (Roitt *et al* 1997). Segundo Martins (2000), o desenvolvimento das vacinas depende de três fatores: 1) do interesse econômico ou estratégico, 2) do conhecimento da patogenia da infecção, e 3) do conhecimento das características dos microrganismos.

No decorrer dos anos, diversos métodos de vacinação foram desenvolvidos, como as vacinas que utilizam organismos vivos e atenuados, organismos mortos ou inativados, fragmentos subcelulares e toxóides (Roitt *et al* 1997, Silva 1997, Azevedo & Oliveira 1998, Silva 2000, Simmerman 2002).

Entretanto, apesar da existência destes variados tipos de vacinas, diversas barreiras ainda precisam ser vencidas no combate às doenças infecciosas, pois, mesmo com o amplo uso de vacinas atenuadas ou inativadas em várias dessas doenças, elas apresentam problemas em relação à segurança. Nas vacinas atenuadas pode ocorrer reversão ao tipo selvagem, desenvolvimento de doença grave em pacientes imunocomprometidos, infecção persistente, hipersensibilidade a antígenos virais, hipersensibilidade aos antígenos de ovos (no caso de vacinas desenvolvidas em ovos). Nas vacinas inativadas pode ocorrer inativação inadequada, contaminação com fungos, contaminação com viroses animais, e contaminação por endotoxinas (Roitt *et al* 1997, Silva 2000).

Uma outra questão a ser considerada é que certas vacinas são restritas a determinados grupos de pessoas por diferentes motivos: 1) grupos de risco, como

pessoal da área de saúde, ou pessoas que vivem em locais de alta incidência da doença ou que tenham contatos confinados com portadores, por exemplo, a raiva, hepatite B, tuberculose, e influenza, 2) viajantes, pelo fato de que algumas doenças apresentam restrição geográfica, como febre amarela, meningite, febre tifóide, cólera, hepatite A. 3) idosos, é o caso das vacinas contra influenza (gripe) e pneumonia, 4) doenças provocadas por cepas diferentes, por exemplo, influenza, pois a elaboração dessas vacinas acarretaria prejuízos econômicos, devido ao alto valor empregado na fabricação destas; 5) ausência de rede de refrigeração, porque muitos países, como a África, não dispõem dessa rede necessária para a conservação de muitos tipos de vacinas. (Roitt *et al* 1997).

Além disso, há doenças para as quais não existem vacinas disponíveis devido ao risco de contaminar o indivíduo quando ele entrar em contato com o microrganismo, essas doenças são: HIV, herpes vírus, adenovírus e rinovírus (resfriado comum), estafilococos, estreptococos do grupo A, *Mycobacterium leprae* (hanseníase), *Treponema pallidum* (sífilis), *Chlamydia trachomaatis* (tracoma, uretrite), cândida, *pneumocystis*, malária, tripanossomose (doença do sono e doença de chagas), leishmaniose, esquistossomos, oncocercose (Roitt *et al* 1997, Lima *et al* 2000).

Entre estes problemas, ainda se encontra outro relatado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que diz que “*Em todo mundo nascem por ano em torno de 130 milhões de crianças, das quais cerca de 12 milhões morrem com idades entre 0 e 14 anos. Dessas mortes, cerca de 9 milhões são causadas por doenças infecciosas, tais como as já citadas. O mais grave é que 3 milhões de mortes ocorrem por causa de doenças contra as quais já existem vacinas de uso rotineiro, como é o caso da tuberculose, da difteria, da coqueluche e do sarampo*” (Silva 1997).

A busca de soluções para estes problemas está na tecnologia e seus avanços que buscam desenvolver novas vacinas, como as vacinas recombinantes e a vacina gênica (Silva 1997, Azevedo & Oliveira 1998, Silva 2000, Srivastava & Liu 2003).

A vacina gênica também chamada de vacina de DNA ou vacina de ácidos nucléicos é um novo método de imunização e imunoterapia podendo ser empregada

contra vírus, bactérias, parasitas e tumores (Donnelly & Ulmer 1999). Essa vacina consiste em introduzir nas células do indivíduo um gene codificador de uma proteína antigênica de um determinado patógeno, o qual está inserido em um DNA plasmidiano, a fim de gerar uma resposta imune com produção de memória imunológica (Silva 1997, Azevedo & Oliveira 1998, Silva 2000, Srivastava & Liu 2003).

A vacina gênica é uma alternativa que oferece uma série de vantagens sobre os outros tipos de imunização, além de ser uma solução ou alternativa para os males como o câncer e doenças infecciosas, como a AIDS, que não dispõem de uma prevenção segura e que vêm afligindo a humanidade por muito tempo.

2. HISTÓRICO

2.1. A descoberta da vacina

Na busca de uma solução para reduzir os prejuízos causados pela varíola em todo o mundo, foi estabelecida a técnica de **variolização** que consistia na inoculação de pus seco das lesões variólicas em indivíduos sãos. Essa técnica foi empregada da China à Índia, depois passou pelo Oriente Médio, Turquia, até chegar na Europa aproximadamente no ano 1700. Em seguida foi popularizada na Inglaterra e seguiu para a América do Norte. Entretanto, além de não ter alcançado a prevenção em certas pessoas, essa prática era polêmica pelo fato de haver a possibilidade de causar riscos e complicações no receptor (Martins 2000).

Edward Jenner (1749-1823) em 1788 praticava a variolização diariamente, mas observou que suas inoculações tinham pouco efeito naquelas pessoas que tinham tido, anteriormente a varíola bovina. Por 25 anos, desde 1775, ele estudou a relação entre varíola bovina, varíola e variolização e em torno do ano 1800 criou uma prática a qual denominou **varíola vaccine** (varíola da vaca) por esta utilizar um material vindo das vacas, que em latim é escrito *vacca*. O nome *varíola vaccine* foi

simplificado para vacina, passando a ser empregada, a partir daí, em todas as técnicas de prevenção a doenças infecciosas (Martins 2000).

2.2. Os progressos da vacina

A pouco mais de cem anos atrás, mesmo sem muitos conhecimentos de imunologia, Pasteur e seu grupo iniciaram o uso de microrganismos modificados em vacinas e constituíram a base para obtenção de vacinas vivas ou mortas (Roitt *et al* 1997, Martins 2000).

As técnicas iniciadas por Pasteur e seu grupo foram sendo aperfeiçoadas com o emprego de novas descobertas. Os microrganismos ou toxinas passaram a ser tratados com formaldeído para retirar a sua patogenicidade mantendo sua imunogenicidade. Em 1931, Goodpasture descobriu um meio de cultura para vírus na membrana corioalantóide do ovo de galinha fertilizado que passou a ser utilizado para produzir vacinas contra febre amarela, influenza e rickettsias. No final dos anos 40 Enders e seus colaboradores utilizaram fibroblastos da pele e músculo de recém nascidos mortos como um meio de cultura para os vírus, o que possibilitou o surgimento das **vacinas virais vivas e não-vivas**, como as de poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola, caracterizadas por sua ótima imunogenicidade, sendo que os nomes de Salk, Sabin, Koprowski, Schwarz, Hilleman, Plotkin e muitos outros pesquisadores estão ligados ao desenvolvimento dessas vacinas. (Martins 2000).

Depois da descoberta das vacinas utilizando organismos vivos naturais ou atenuados e organismos mortos e inativados, outras formas de vacinação foram desenvolvidas, como a vacina de **toxóide** usada contra difteria e o tétano, descobertas em 1980 por Schneerson e colaboradores e licenciada desde 1987 (Martins 2000). Com o desenvolvimento da biologia molecular houve um avanço enorme no conhecimento da patogenia das doenças, possibilitando a obtenção de novas vacinas, mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes e as

vacinas gênicas (Silva 1997, Azevedo & Oliveira 1998, Silva 2000, Srivastava & Liu 2003).

2.3. A Vacina Gênica

A vacina gênica que veio inovar a vacinologia com um novo caminho de administração de antígenos tem por princípio a tecnologia do DNA recombinante, também conhecida como engenharia genética. Essa tecnologia é definida por Raven *et al* (2001) como uma tecnologia “*baseada na habilidade de cortar com precisão moléculas de DNA de diferentes procedências, originando pedaços específicos, e de combinar tais pedaços para produzir novas recombinações*”.

Essa técnica utiliza basicamente: DNA de plasmídeo, enzima de restrição, DNA ligase e *Escherichia coli*. Os plasmídeos são fragmentos de DNA extracromossômico circulares presentes nas bactérias e que carregam genes que conferem resistência das bactérias à antibióticos, o que foi descoberto no ano 1965. As enzimas de restrição reconhecem seqüências específicas do DNA e o cortam formando extremidades coesivas, elas foram isoladas pela primeira vez em 1970. Já a DNA ligase foi descoberta em 1972, desde então, passou a ser usada para ligar fragmentos de DNA entre si gerados por enzimas de restrição. Por fim, em 1973 foi descoberto que fragmentos estranhos inseridos no DNA plasmidiano podem ser reinseridos e funcionar na bactéria *E. coli* (Poland *et al* 2002).

A vacina gênica teve seu conceito básico apresentado em 1992 (Silva 2000) e em 1993 foi demonstrado por pesquisadores da indústria farmacêutica Merck que a injeção intramuscular de um gene poderia ser empregada como vacina gênica. Desde então foram desenvolvidas vacinas gênicas contra vários patógenos em diferentes modelos animais (Silva 1997).

2.4. Pesquisas realizadas com a vacina gênica

Apesar de ainda não ter vacinas gênicas disponíveis, muitas delas se encontram em fases de pesquisas (Silva 2000, Srivastava & Liu 2003).

A primeira vacina gênica testada em modelos animais foi a vacina contra o vírus influenza (Donnelly & Ulmer 1999). Desde 1990, a vacina gênica vem sendo testada em uma variedade de modelos animais - rato, gado, cachorro, furões, e primatas não humanos - contra diferentes patógenos, como vírus da imunodeficiência humana, hepatite, malária, tuberculose, herpes simplex (Oliveira *et al* 1999), vírus da coriomeningite linfomonocitária, vírus sincicial respiratório bovino (Silva 2000), dengue, tétano (Donnelly & Ulmer 1999), esquistossomose (Lima *et al* 2000), vírus de raivas, papilomavírus e câncer (Srivastava & Liu 2003).

Algumas vacinas genéticas se encontram em ensaios clínicos sem apresentar nenhum problema sério de segurança (Silva 2000). E ainda, vêm sendo pesquisadas em combinação com outros tipos de vacinas (Srivastava & Liu 2003).

No Brasil, desde 1991, vem sendo pesquisada uma vacina gênica contra a tuberculose pelo Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Lima *et al* 2000).

Devido aos correntes progressos, a vacina gênica poderá se tornar comerciável em alguns anos. Simmenrman (2002) acredita que as vacinas gênicas estarão disponíveis em aproximadamente dez anos.

3. FABRICAÇÃO DA VACINA GÊNICA

O processo de fabricação da vacina gênica é realizado através da tecnologia do DNA recombinante. E os passos para esta fabricação são: 1) extração do DNA, 2) purificação do DNA, 3) recombinação gênica, 5) transformação bacteriana, 6) amplificação/ clonagem, 7) triagem, e 8) isolamento.

3.1. Extração do DNA

O procedimento da elaboração dessa vacina, empregando a tecnologia do DNA recombinante, inicia-se com a extração do DNA de um microrganismo que

pode ser um vírus, uma bactéria, um fungo ou um parasita, a fim de obter deles o gene codificador da proteína antigênica. E a extração de um DNA plasmidiano de uma bactéria *E. coli*, bactéria do trato gastrointestinal, o qual servirá com vetor que carregará o gene do patógeno.

3.2. Purificação do DNA

Essa etapa do processo é importante para separar do genoma do patógeno o gene codificador da proteína antigênica.

Essa etapa pode ser dividida em dois procedimentos:

a) Fragmentação do DNA

Nesse procedimento o DNA extraído do patógeno é colocado em um tubo de ensaio onde é fragmentado especificamente por enzimas chamadas de enzimas de restrição (endonuclease de restrição) (Winter & Winter 1988).

As enzimas de restrição são provenientes de bactérias. As mais utilizadas nesse processo são as enzimas *EcoRI* (retiradas das bactérias *E. coli*) e *HindIII* (retirada da bactéria *Haemophilus influenzae*). A denominação dessas enzimas é feita de acordo com a bactéria da qual foram extraídas, sendo a primeira letra referente ao gênero da bactéria, a segunda e terceira letra se baseiam nas duas primeiras letras do epíteto e o numeral romano indica a prioridade de descoberta da enzima naquela cepa (Lodish *et al* 2002).

Essas enzimas reconhecem seqüências específicas do DNA dupla-hélice, essas seqüências são denominadas de seqüências de reconhecimento ou sítios de restrição, as quais têm de 4 ou 8 nucleotídeos e são simétricas, ou seja, a seqüência do sítio de restrição é a mesma em cada fita de DNA, quando lida na direção 5' --> 3'. As enzimas de restrição usadas nesse processo produzem cortes chamados denteados que formam “pontas adesivas” de fitas simples complementares, também chamadas extremidades coesivas (extremidades complementares) onde as duas fitas cortadas

podem emparelhar-se com uma outra fita cortada com a mesma enzima de restrição, formando moléculas quiméricas (Lodish *et al* 2002).

Os cortes decorrentes do uso da enzima de restrição são demonstrados na figura 1.

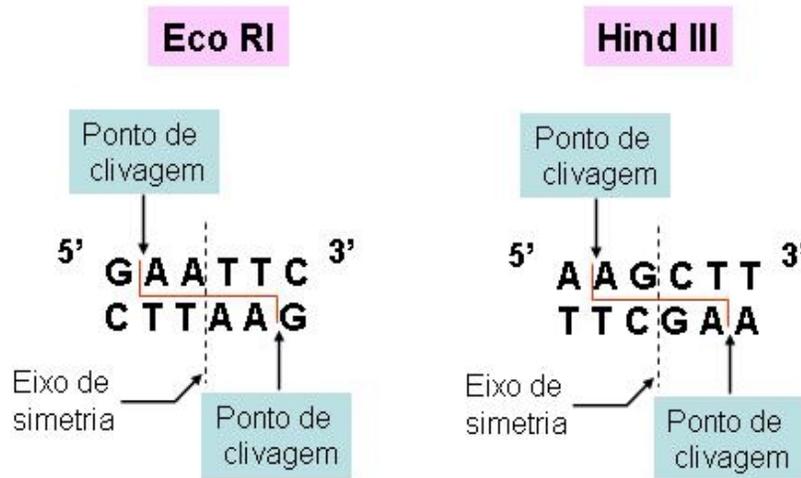


Figura 1: As setas indicam a ponte fosfodiéster clivadas pelas enzimas EcoRI e HindIII. A linha pontilhada indica o eixo de simetria do palíndromo. A linha laranja mostra o corte oblíquo das duas enzimas, que gera extremidades coesivas. Fonte: Hpg 2003.

b) Separação dos fragmentos do DNA

Os fragmentos do DNA do patógeno cortados pelas enzimas de restrição serão, então, submetidos a um processo denominado eletroforese em gel, o qual consta da migração dos fragmentos em um determinado gel de acordo com sua massa e sua carga. O gel utilizado pode ser gel de agarose ou gel poliacrilamida. Sendo que a agarose, proveniente de algas marinhas, é o gel mais utilizado para separar ácidos nucléicos porque tem largos poros o que permite a separação dessas macromoléculas. E ainda o tamanho dos poros desse gel pode ser regulada de acordo com a concentração, pois quanto maior sua concentração (gramas de agarose por ml de solução tampão), menor o tamanho de seus poros. (Biomania 2003).

Durante a eletroforese, os fragmentos migram no gel, e essa migração depende de dois fatores: 1) massa, as moléculas que migram primeiro são de que contêm menor massa, 2) natureza elétrica das partículas, dependendo da natureza elétrica os fragmentos podem migrar para o cátodo (+) ou para o ânodo (-) (Biomania 2003). A figura 2 mostra os fragmentos que foram submetidos à eletroforese em gel.

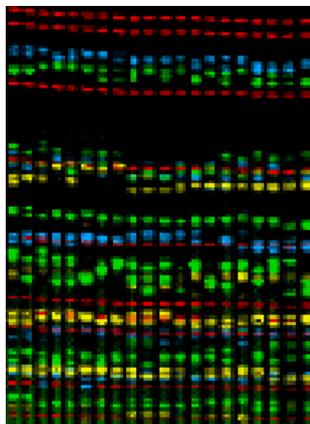


Figura 2: Nessa figura são mostrados os fragmentos separados pela eletroforese em gel. Fonte: Biomania 2003.

Com a separação dos fragmentos do DNA pode-se isolar o gene desejado do patógeno.

3.3. Recombinação Gênica

Depois que o gene do patógeno foi purificado, ou seja, o gene codificador da proteína antigênica foi isolado, esse gene será inserido em um vetor. O vetor utilizado é o DNA plasmidiano que também terá que ser cortado para que o gene do patógeno possa ser inserido. Contudo os cortes do plasmídeo devem ser feitos com a mesma enzima de restrição utilizada para cortar o DNA do patógeno de modo a formarem extremidades complementares para que assim possam se recombinar. A ligação dos dois DNAs são feitos pela ação da enzima DNA ligase que catalisa a formação de

ligações fosfodiéster 3' --> 5' entre os fragmentos curtos da fita de DNA (Lodish *et al* 2002). A recombinação gênica está representada na figura 3.

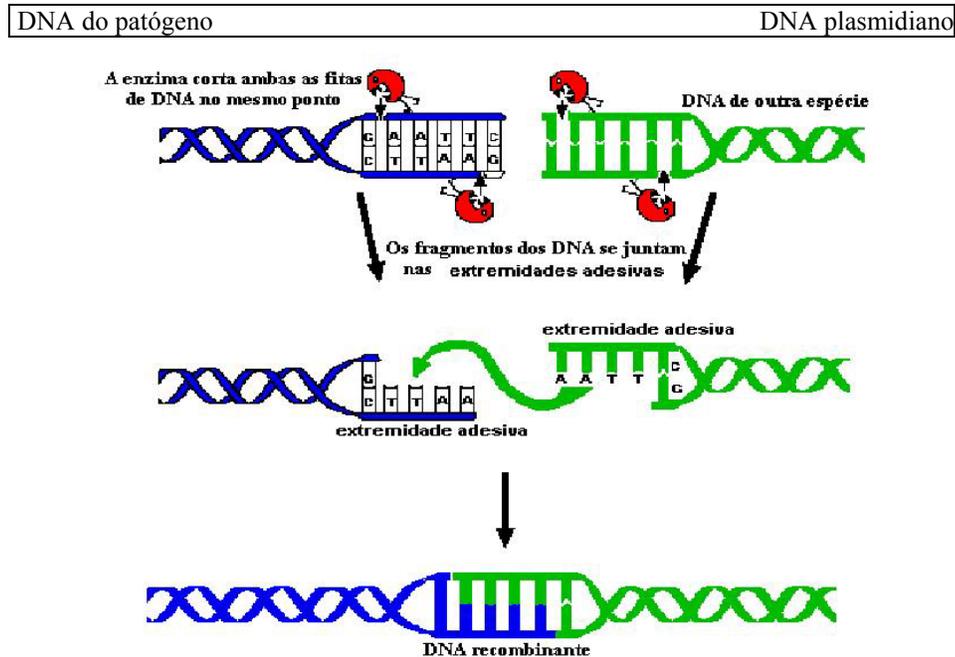


Figura 3: Ação da enzima de restrição EcoRI, com geração de extremidades coesivas e união de fragmentos de DNA de origens distintas. Fonte: Hpg 2003.

O DNA plasmidiano usado na imunização genética consiste em um anel de DNA de dupla fita extracromossômico presente em bactérias e é extraído da bactéria *E. coli*. Para ser funcional o plasmídeo tem que conter: 1) Origem de replicação (ORI) que é uma seqüência específica de DNA de 50-100 pares de bases essenciais para que o plasmídeo possa se replicar, 2) uma região em que possam ser inseridos fragmentos de DNA exógeno, 3) um gene que confere resistência a antibiótico (marca ou pressão de seleção), como o gene amp^r , que confere resistência ao antibiótico ampicilina; 4) seqüências específicas que permitem a expressão gênica em células procarióticas (bactérias) e células eucarióticas (mamíferos); 5) Promotores especiais utilizados no processo de transcrição e tradução, como um promotor forte eucariótico, tal como, o promotor inicial do citomegalovírus; 6) um terminador de transcrição tal

como o do hormônio de crescimento bovino (Donnelly & Ulmer 1999, Lodish *et al* 2002). Esse DNA plasmidiano está representado na figura 4.

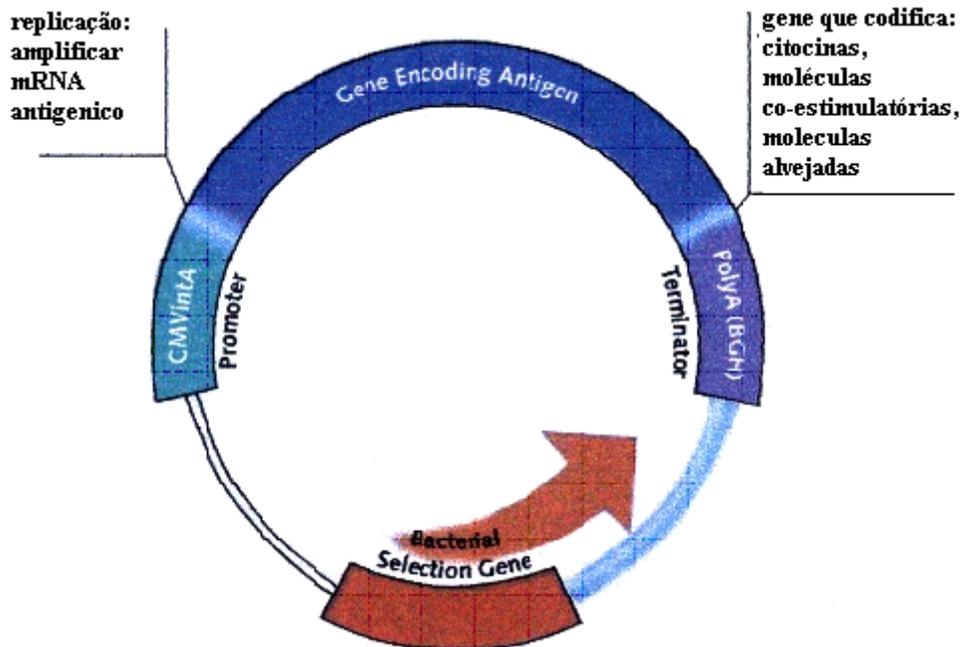


Figura 4: Nessa figura está representado um plasmídeo contendo gene que codifica o antígeno em azul, um promotor em verde, um terminador em roxo. Fonte: Srivastava & Liu 2003.

Contudo, durante a recombinação do DNA plasmidiano com o DNA do patógeno os dois DNAs são misturados para que ocorra o emparelhamento das duas extremidades complementares. Esta mistura do plasmídeo com o gene do microrganismo, além de produzir o plasmídeo com inserto, podem ser formados mais quatro produtos indesejáveis: 1) os genes do microrganismo podem se unir fundindo-se formando um círculo, no entanto, acabará sendo descartado espontaneamente por não possuir uma origem de replicação bacteriana; 2) Pode ocorrer de dois plasmídeos ou mais se unirem, porém, este terá uma replicação muito lenta o que fará com que acabe desaparecendo; 3) pode ser formado um plasmídeo com vários insertos ligados em cadeia ou com um inserto muito grande, mas este também acabará sendo extinto; 4) o problema maior será se o plasmídeo não receber o inserto, porque este poderá se

replicar normalmente, e só poderá ser descartado do processo com um procedimento de triagem explicado mais adiante (Hpg 2003). A figura 5 mostra os cinco produtos que podem ser formados durante a mistura do gene do microrganismo com o DNA plasmidiano.

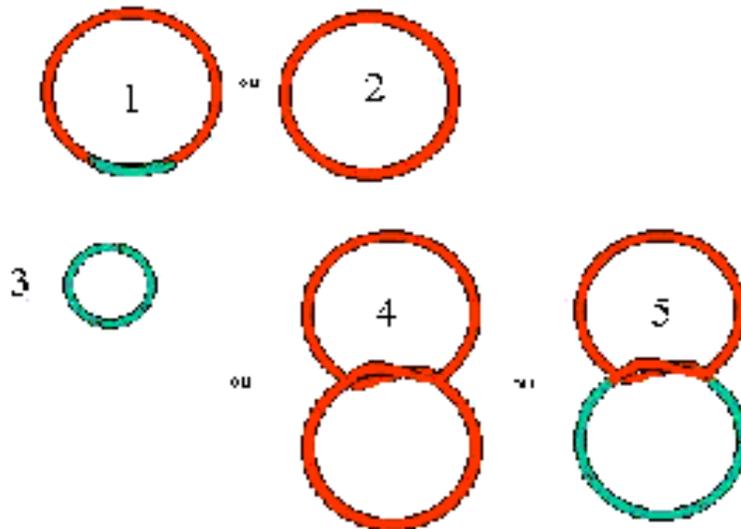


Figura 5: O número 1 é o desejado, o nº 2 é o plasmídeo sem inserto, o nº 3 é a junção de vários insertos, o nº 4 é a união de dois plasmídeos e o nº 5 é um plasmídeo com um inserto muito grande. Fonte: Hpg 2003.

3.5. Transformação bacteriana

Após a clonagem do gene, o DNA plasmidiano será introduzido em uma bactéria *E. coli*, esse processo é chamado de transformação bacteriana. A entrada do DNA plasmidiano se dará de forma passiva através da membrana da bactéria previamente tratada com uma solução de cloreto de cálcio, ou ativamente através de choques elétricos – processo chamado eletroporação (Hpg 2003) sendo que a inclusão deverá ocorrer de tal forma que a seqüência de DNA seja reconhecida pela bactéria como seu (Winter & Winter 1988).

3.6. Amplificação/ Clonagem

Nesse procedimento, as bactérias transformadas são colocadas numa placa de Petri de ágar nutrientes. O DNA inserido é replicado juntamente com o restante do DNA plasmídial, sendo segregado para as células-filhas à medida que a colônia vai crescendo. Como todas as células numa colônia têm origem numa só célula-mãe transformada, elas constituem um clone de células (Lodish *et al* 2002).

3.7. Triagem

Na placa de Petri, além do ágar nutrientes, é colocado o antibiótico ampicilina. Com isso todas as bactérias que não tiverem o plasmídeo contendo o gene resistente a ampicilina, serão eliminados e sobreviverão apenas as células transformadas contendo o gene de resistência a antibiótico no vetor plasmídial (Lodish *et al* 2002).

Além de descartar a bactéria sem o plasmídeo, os plasmídeos sem insertos também poderão ser descartados, estes são resistentes também à tetraciclina, e os plasmídeos com inserto não são resistentes a esse antibiótico, pois o perdeu durante a recombinação gênica, assim as colônias que crescerem nesse meio contendo tetraciclina não interessarão (Hpg 2003). Esses procedimentos de eliminação de produtos indesejáveis são chamados de triagem.

3.8. Isolamento

Por último, os DNAs de plasmídeos são isolados das bactérias e estarão prontos para serem usados como vacina gênica (Lima *et al* 2000).

Os procedimentos para a fabricação da vacina gênica pode ser visualizados na figura 6.

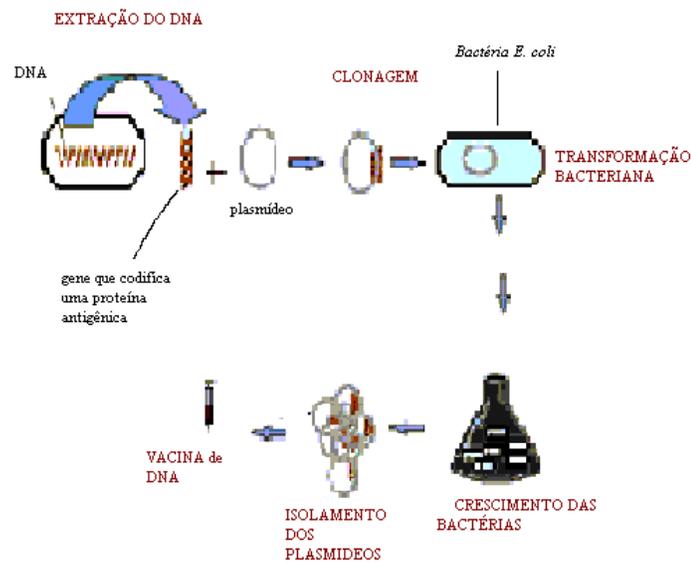


Figura 6: A figura mostra os passos para a fabricação da vacina gênica: 1) extração do DNA, 2) recombinação gênica 3) transformação bacteriana, 4) amplificação/clonagem, 5) isolamento. Fonte: Comciencia 2003.

4. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

As duas principais vias de administração para introduzir a vacina no hospedeiro são a via intramuscular e a via intradérmica.

4.1. Via de Administração Intramuscular

A via intramuscular é a mais utilizada na imunização genética (Oliveira *et al* 1999). Nesta via o DNA plasmidiano pode ser injetado por intermédio de uma injeção intramuscular (i.m.) diretamente no músculo esquelético do animal, que pode ser nos músculos femural ou músculos quadríceps. É inoculada em cada perna do animal aproximadamente 50 microlitros (ml) do plasmídeo em uma concentração de 1 mg/ml (Azevedo & Oliveira 1998).

Em Oliveira *et al* (1999) é dito que o DNA plasmidiano diluído em solução salina pode ser injetado diretamente para dentro do músculo do animal, ou pode ser

aplicado uma injeção de toxina ou um anestésico local, por exemplo, bupivacaína, para causar necrose e regeneração do músculo injetado, aumentando assim a expressão do antígeno codificado o que resulta em amplificação da resposta imune. Entretanto, em Lima *et al* (2000) é dito que esses procedimentos não são aceitáveis para serem empregados em humanos devido aos efeitos colaterais.

A injeção intramuscular coloca o plasmídeo em meio extracelular (Lima *et al* 2000). Ela foi empregada pela primeira vez contra o vírus influenza, depois ela passou a ser utilizada contra a *Leishmania major*, *Plasmodium yoelli*, *Mycobacterium tuberculosis*, vírus da dengue e vírus do herpes simples (Oliveira *et al* 1999).

4.2. Via de Administração Intradérmica

A aplicação da vacina gênica utilizando a via intradérmica de administração emprega um processo chamado biobalística, o qual consiste em colocar o DNA plasmídico sobre micropartículas de ouro (0,2 a 4,0 nm de diâmetro) e introduzi-las na derme do animal através de um aparelho conhecido como gene gun (arma de gene). Essa introdução das micropartículas é realizada em alta velocidade, ou seja, com velocidades superiores a 1.500 km/h. A onda de choques necessários para deslocar a molécula de DNA é gerada por intermédio do gás hélio a baixa pressão (Azevedo & Oliveira 1998).

O aparelho gene gun, projetado e construído pelo Dr. Elíbio L. Rech do Centro Nacional de Pesquisas em Recursos Genéticos e Biotecnologia da EMBRAPA (Azevedo & Oliveira 1998), está ilustrado na figura 7.



Figura 7: gene gun. (Ultimo segundo 2003).

Foram demonstradas que as micropartículas de ouro contendo o plasmídeo são colocadas no interior das células, elas penetram a membrana plasmática sem causar dano e vão se localizar aleatoriamente em organelas (Azevedo & Oliveira 1998). Isto pode ser comprovado na figura 8.

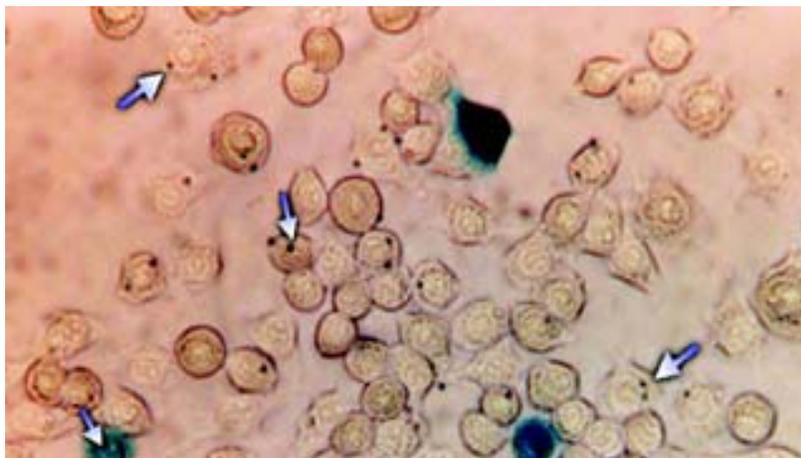


Figura 8. As setas indicam as micropartículas de ouro no citoplasma da célula, através do processo de biobalística (Lima *et al* 2000).

O grupo do Dr. Stephen Johnston da Universidade do Texas (Southwestern Medical Center, TX) foi o primeiro a utilizar o processo de biobalística para induzir uma resposta imune contra a luciferase através de bombardeamento de DNA na derme de camundongos BALB/c (Azevedo & Oliveira 1998). Tang *et al* (1992) foram os primeiros a demonstrar resposta imune humoral por essa técnica. Logo depois, Fynan *et al* (1993) e Webster *et al* (1994) usaram esse método em um rato com vírus influenza. Hui *et al* (1994) foram os primeiros a evidenciar a resposta imune celular estimulada por essa técnica. E respostas citolíticas também foram desenvolvidas em ratos bombardeando para dentro da pele do animal os genes env e gp120 do HIV. Este método está sendo empregado em estudos contra os seguintes agentes causadores de doenças infecciosas: vírus coriomeningite linfocitária, plasmodium berghei, vírus ebola, vírus psudorabis, rotavírus, e mycoplasma pulmonis (Oliveira *et al* 1999).

4.3. Vantagens e Desvantagens das duas principais Vias de Administração

Tanto a via de administração intramuscular quanto a via intradérmica apresentam vantagens e desvantagens.

A injeção intramuscular tem um custo menor comparado com a técnica de biobalística, pois a biobalística necessita do aparelho gene gun, o qual tem um preço superior comparado à simples seringas e agulhas utilizadas na injeção intramuscular (Lima *et al* 2000).

Porém, a via intramuscular requer uma quantidade de DNA plasmidiano cem vezes superior do que a via intradérmica, pois o método de biobalística utiliza menos de 1 mg de DNA plasmidiano, e a injeção intramuscular necessita de aproximadamente 100 mg (Azevedo & Oliveira 1998). Essa diferença na quantidade é devida à eficácia da transfecção, pois enquanto o processo de biobalística entrega o DNA dentro das células, a injeção intramuscular coloca o DNA no meio extracelular estando, portanto, esse sujeito à degradação por nucleases, o que ocorre rapidamente (Oliveira *et al* 1999).

Entretanto, esses dois meios de entrega de gene não têm eficácia contra patógenos que penetram no organismo através de superfícies mucosas, como do trato respiratório, gastrointestinal ou urogenital entre outras, pois não estimulam imunidade nesses tecidos, com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de outras estratégias de administração, como exemplo através de lipossomos (Lima *et al* 2000).

5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA (Mecanismo de Ação da Vacina Gênica)

A resposta imunológica protege o organismo de infecção, tumores, surgimento de doença auto-imune, e induz rejeição de enxertos não compatíveis. Existem dois tipos de resposta imune: imunidade inata e imunidade adaptativa. A resposta imune inata é caracterizada por não ser uma resposta específica e não gerar células de memória imunológica, ela ocorre durante um primeiro contato do

indivíduo com o antígeno (“*toda estrutura capaz de reagir com as células do sistema imune*”), envolvendo células fagocitárias como macrófagos, monócitos e neutrófilos. Já a resposta imune adaptativa ocorre na tentativa de eliminar o patógeno que conseguiu passar pela resposta imune inata; essa resposta gera células efectoras antígeno-específica, principalmente linfócitos T e B, os quais são as únicas células que reconhecem especificamente os diferentes determinantes antigênicos (Fischer & Scrofenerker 1998).

As vacinas trabalham primariamente para estimular resposta imune adaptativa específica e para extrair resposta imune humoral e celular.

Após a administração da vacina gênica, não importa a via de administração o DNA plasmidiano se alojará no núcleo das células do receptor. Em relação ao DNA plasmidiano localizados extracelularmente, através da via intramuscular, os que não foram degradados por nucleases serão endocitados pelas células e migrarão para o núcleo.

Após a penetração do DNA plasmidiano no núcleo da célula, o gene contido no plasmídeo que codifica o antígeno é copiado em uma fita de RNA mensageiro, os quais são em seguida traduzidos em proteínas no citoplasma. Em seguida, a proteína antigênica pode simplesmente sair da célula, sendo posteriormente capturada por uma célula apresentadora de antígeno (APC), ou ser cortada em fragmentos chamados peptídeos antigênicos os quais serão expostos na superfície da célula alvo (Weiner & Kennedy 1999). Portanto a vacina gênica é capaz de induzir ambas as respostas imunológicas humoral e celular (Silva 97, Azevedo & Oliveira 98, Donnelly & Ulmer 99, Srivastava & Liu 2003).

5.1. Resposta imune celular

Na resposta imune celular ocorre a eliminação de células que foram colonizadas por um invasor. Nessa resposta a proteína antigênica é degradada em peptídeos antigênicos na própria célula que a sintetizou, ou seja, as células alvo, que pode ser qualquer célula nucleada do organismo. Na via exocítica, que levará os

peptídeos para a superfície da célula, ocorre o acoplamento do peptídeo antigênico com a molécula do MHC classe I, e este complexo será exposto na membrana celular e assim o peptídeo antigênico será reconhecido pela célula T- citotóxica, também chamada de célula T CD8+ (Ordovás & Scrofenerker 1998).

Após o reconhecimento pelo linfócito T- citotóxico estes se tornam ativados. Mas, além desse reconhecimento, para ocorrer a ativação tanto dos linfócitos T- citotóxico quanto dos linfócitos T- auxiliares é necessário também a ligação de moléculas co-estimulatórias, as quais são responsáveis por um segundo sinal necessário para a ativação das células T e na ausência dessas moléculas co-estimulatórias pode ocorrer irresponsividade da célula T tanto à fatores de crescimento quanto à apresentação antigênica (Ordovás & Scrofenerker 1998).

Após a ativação das células T ocorre a proliferação celular, seleção clonal e em seguida inicia-se a fase efetora onde ocorre: 1) secreção de linfocinas (citocinas) que visam combater o antígeno e elas têm a função de estimular e regular a diferenciação de linfócitos (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ), de ativar e regular células efectoras especializadas (IFN- γ – macrófagos, IL-5- eosinofilo) e estimular a hematopoiese (IL-3); 2) citotoxicidade por contato célula a célula que é um mecanismo que elimina as células infectadas, por lise celular, lise osmótica ou apoptose (Ordovás & Scrofenerker 1998).

As células T citotóxica (CTL) ativadas possuem grânulos citoplasmáticos que contêm moléculas tóxicas. O conteúdo de alguns dos grânulos é liberado no espaço intercelular entre o CTL e a célula-alvo após a fusão das membranas dos grânulos com a membrana plasmática. Esse conteúdo desencadeia um programa suicida, denominado morte celular programada ou apoptose, em que a célula e seu núcleo sofrem contração e, freqüentemente tornam-se fragmentados (Sharon 2000).

São formadas também nessa resposta imune células de memória imunológica, as quais protegem o organismo contra novas infecções, pois se essas células forem posteriormente ativadas irão formar ciclos de replicação para produzir mais células de memória e novos plasmócitos, ocorrendo, assim, uma resposta imune mais rápida e mais eficiente (Ordovás & Scrofenerker 1998).

5.2. Resposta imune humoral.

Na resposta imune humoral ocorre o ataque ao patógeno fora da célula. Nessa resposta as proteínas antigênicas podem sair da célula e posteriormente se ligar à célula apresentadora de antígeno (*“célula capaz de se ligar a um antígeno de forma inespecífica ou pouco específica fagocitá-lo, processá-lo e expressá-lo na membrana celular juntamente com as moléculas do MHC classe II”, como macrófago, células dendríticas, células B, células endoteliais, células epiteliais, células de langherhans*”) e penetrar nelas por endocitose, fagocitose ou pinocitose (Eckert *et al* 1998). Entretanto, em Srivastava & Liu (2003) é dito que não está claro se as APC poderiam alcançar o plasmídeo ou se a proteína antigênica alcançaria as células APC corretas.

No interior dos endossomos ou lisossomos, as proteínas antigênicas são degradadas por proteases ativas em pH ácidos em moléculas menores, chamadas peptídeos antigênicos. Os peptídeos antigênicos se acoplam às moléculas do MHC classe II, as quais foram sintetizadas pela própria APC, e o complexo formado é exposto na superfície celular e serão reconhecidos pelos linfócitos T-auxiliares, também chamados de linfócitos T CD4+ (Eckert *et al* 1998).

Também na resposta humoral, linfócitos B são ativados. Essa ativação pode ser T-dependente, ou seja, depende do contato com o linfócito T-auxiliar e secreção de citocinas; ou a ativação pode ser T-independente, onde o contato com o antígeno é o suficiente para que ocorra a ativação. Os linfócitos maduros que não tiver tido contato com o antígeno tem vida curta e morrerão em poucos dias caso esse contato não ocorra. Contudo, se o linfócito B entrar em contato com o antígeno ocorrerá a expansão clonal (divisão) e diferenciação resultando em: 1) plasmócitos que produzirão anticorpos específicos os quais têm função de inativar toxinas e outros agentes químicos, inativação de vírus, lise de bactérias, opsonização, participação na citotoxicidade dependente de anticorpo, fixação e ativação de complemento, regulação da resposta imunológica, e participação de reações auto imunes e alergias; 2) células de memória – os linfócitos que não se diferenciarem em plasmócitos voltam ao estágio G0 do ciclo celular e tornam-se células de memória (Eckert *et al* 1998).

A figura 9. Ilustra todo o processo de resposta celular e humoral.

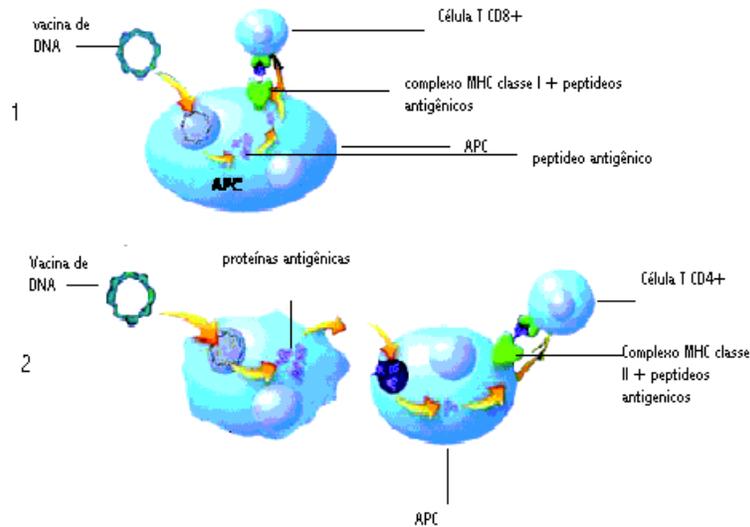


Figura 9: Esse desenho mostra os dois tipos de resposta imunológica: a resposta imune celular representada pelo número 1 e resposta imune Humoral representada pelo número 2. Fonte: Srivastava & Liu 2003.

A vacina gênica se aproxima de uma infecção natural por induzir ambas as respostas humoral e celular, e ainda, pelo fato de produzirem memória imunológica quando o indivíduo entrar em contato com o patógeno, este pode ser rapidamente eliminado mesmo antes de causar uma doença aparente.

5.3. Relação da via de administração com a resposta imunológica.

A resposta imune induzida por essa vacina depende principalmente do tipo de método aplicado para a administração, pois estudos mostraram que a injeção intramuscular e a técnica de biobalística desencadeiam respostas imunes diferentes (Azevedo & Oliveira 1998).

As células T- auxiliares são agrupadas em subconjuntos funcionais caracterizadas pela citocina particular que elas produzem: as células T- auxiliares do tipo TH1 produzem citocinas IL-2, INF- γ e desenvolvem resposta imune celular, as

células T- auxiliares do tipo TH2 produz IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e promove a ativação de células B, e células T- auxiliares do tipo TH0 consta uma combinação de TH1 e TH2. Pesquisas feitas com ratos revelaram que respostas de anticorpo produzidas por células TH1 são predominantemente do isotipo imunoglobulina IgG2a, enquanto que respostas dirigidas por células TH2 são predominantemente do tipo de imunoglobulinas IgG1. Foi demonstrado que quando aplicada a injeção intramuscular a resposta imune obteve um padrão de resposta do tipo TH1, pois culturas antígeno-estimuladas conteve níveis altos de IL-2 e IFN- γ com pouca ou nenhuma manifestação de IL-4 ou IL-5. Já quando utilizou-se o processo de biobalística foi obtido um tipo de resposta imune TH0 (Donnelly & Ulmer 1999).

Em Azevedo & Oliveira (1998) é dito que o padrão de resposta imune TH1 induzido pela injeção intramuscular pode ser utilizado para combater infecções intracelulares como a leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, brucelose, listeriose e alergias, enquanto que o padrão TH2 induzido pela biobalística pode ser usado no controle de esquistossomose e outras doenças tropicais.

Uma outra diferença de resposta em relação à via de administração é que pesquisas concluíram que foram alcançados níveis de anticorpos mais altos quando a via de administração se deu por biobalística (Azevedo & Oliveira 1998). A figura 10 mostra as diferenças de níveis de IgG em cada via de administração durante a expressão do gene da b-galactosidase em orelhas de camundongos BALB/c

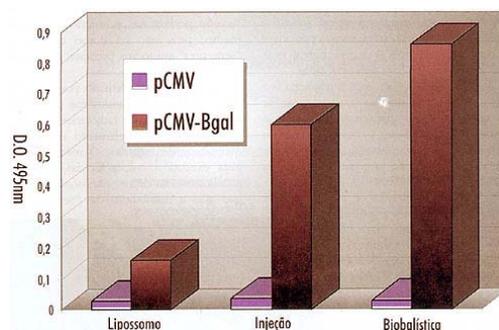


Figura 10: Níveis totais de IgG anti-b-galactosidase determinados por ELISA nos soros de camundongos BALB/c imunizados com os plasmídeos pCMV (grupo-controle) e pCMV-bgal pelos métodos da biobalística, injeção direta no músculo e através do uso de lipossomos. Fonte: Azevedo & Oliveira 1998.

6. VANTAGENS E DESVANTAGENS

6.1. Vantagens

A vacina gênica apresenta uma série de vantagens sobre os outros tipos de vacinas convencionais, pois essa vacina não utiliza o microrganismo na sua fabricação e sim apenas o seu gene que codifica o antígeno, o qual é inserido nas células do hospedeiro estimulando-o a produzir uma resposta imunológica específica contra o patógeno, por isto, essa vacina não oferece o menor risco de reversão do patógeno ao tipo selvagem, assim o indivíduo que receber a vacina estará ileso de contrair infecção (Srivastava & Liu 2003).

Um outro aspecto positivo dessa vacina é que a resposta imunológica desencadeada consta de uma resposta humoral como também de uma resposta celular, com produção de células de memória imunológica, o que juntamente com a constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira resulta em uma resposta imune duradoura (Azevedo & Oliveira 1998, Donnelly & Ulmer 1999, Oliveira *et al* 1999, Srivastava & Liu 2003).

Além disso, a vacina gênica é estável em temperatura ambiente, por ter estabilidade a altas e baixas temperaturas, com isto, não há a necessidade de uma rede de refrigeração, sendo estocada como sedimento seco e no momento da administração é necessária somente uma pequena quantidade de água (Silva 1997).

As vacinas gênicas também oferecem vantagens econômicas em relação a outros tipos de imunizações, pois a produção em larga escala é significativamente menor do que o custo de produção das outras vacinas (Silva 1997, Azevedo & Oliveira 1998, Oliveira *et al* 1999), pois, enquanto a dose da vacina gênica custa US\$ 1, a dose de vacinas feitas com proteínas ou com vírus atenuados é obtida por US\$ 5 (Terra 2003).

Considerando os custos benefícios, prevenir doenças é mais vantajoso economicamente do que tratar doenças. O que pode ser comprovado pelos seguintes dados: 1) investimentos federais no combate à AIDS superam US\$ 700 milhões anualmente (Teixeira 2000), 2) um portador de HIV gasta anualmente R\$ 4.500 em

medicamentos (Teixeira 2000), e 3) o governo brasileiro gasta R\$ 16 milhões por ano no tratamento de pacientes com tuberculose e com a vacina gênica acredita-se que este custo cairia para cerca de R\$ 2 milhões (Uol 2003).

6.2. Desvantagens

Entretanto, as vacinas gênicas apresentam algumas controvérsias, porque a sua aplicação tem a possibilidade de induzir um estado de imunidade ou acelerar doenças autoimunes em pessoas predispostas, no entanto, testes foram feitos e não houve a comprovação de que essa vacina causa doenças autoimunes (Simmernam 2002).

Um outro problema é a possibilidade de incorporação do DNA plasmidiano no genoma da célula do hospedeiro, o que pode causar mutagêneses ou carcinogêneses em decorrência do rompimento de um gene celular, inativação de um gene regulador do ciclo celular, ou ativação de um oncogene (Donnelly & Ulmer 1999, Oliveira *et al* 1999, Simernam 2002). Contudo, para este caso, também foram realizados testes que verificaram a não incorporação do DNA plasmidiano no genoma da célula do hospedeiro (Oliveira *et al* 1999).

7. CONCLUSÃO

Existe uma relação entre a vacina gênica e a terapia gênica podendo até mesmo ser confundidas ou serem consideradas sinônimas, porém apesar de usarem basicamente a mesma técnica, que visa introduzir um gene no organismo do indivíduo, estas podem ser diferenciadas, pois, enquanto a vacina gênica tem por fim prevenir doenças, ou seja, evitar que elas ocorram, a terapia gênica consiste em introduzir um gene “saudável” no hospedeiro com o objetivo principal de corrigir defeitos genéticos, apesar de que poderá ser também usada em doenças cardiovasculares, câncer e AIDS, no entanto a terapia gênica se difere por ter o

objetivo de tratar doenças já estabelecidas. A vacina gênica poderá ser aplicada para prevenir qualquer doença infecciosa seja ela virótica, bacteriana e parasitária, sem a menor possibilidade de reversão. Além disso, é uma vacina que poderá ser usada em qualquer país do mundo porque é estável em temperatura ambiente o que facilita a sua distribuição em Estados e países de difícil acesso, os quais são os locais onde há alta incidência de doenças infecciosas. Portanto, esta vacina será uma excelente arma contra doenças infecciosas que há muito tempo esteve presente na humanidade causando surtos e mortes.

8. BIBLIOGRAFIA

AZEVEDO V. & OLIVEIRA, S.C. Vacinas de DNA. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, Brasil, n. 5, p. 40-43. 1998.

BIOMANIA. Eletroforese. Disponível em: <<http://www.biomania.com.br/biotecnologia/eletroforese.php>> Acesso em 25 de julho de 2003.

COMCIENCIA. Biotecnologia e Vacina Gênica. Disponível em: <www.epub.org.br/comciencia> Acesso em 25 de julho de 2003.

DONNELLY J.J. & ULMER, J.B. DNA vaccines for viral diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. USA, n. 32, p. 215-222. 1999.

ECKERT, U.G; SIMON, K.T. & SCROFERNEKER, M.L. Imunidade Humoral. In: SCROFERNEKER, M.L. & POHLMANN, P.R. *Imunologia. Básica e Aplicada*. 1ª ed, Editora Sagra Luzzatto, Porto Alegre, 1998. cap. 10, p. 173-189.

FISCHER, B.G. & SCROFERNEKER, M.L. Sistema imune Inato e Adaptativo In: SCROFERNEKER, M.L. & POHLMANN, P.R. *Imunologia. Básica e Aplicada*. 1ª ed, Editora Sagra Luzzatto, Porto Alegre 1998, cap 3, p. 41-50.

FYNAN, E.F; WEBSTER, R.G; FUELLER D.H; HAYNES J.R; SANTORO J.C & ROBINSON H.L. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, n. 90, p. 11478-11498. 1993.

HPG. Controle da Expressão Gênica. Disponível em: <www.biomol.hpg.ig.com.br7aula5_clonagem1.htm>. Acesso em 25 de julho de 2003.

HUI, K.M.; SABAPATHY, T.K; OEI A & CHIA, T.F. Generation of allo-reactive cytotoxic T lymphocytes by particle bombardment-mediated gene transfer. *Journal of Immunological Methods, USA*, n. 171, p. 147-155.

LIMA, K.M; SILVA, C.L. & JUNIOR, J.M.R. Microesferas Biodegradáveis. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasil*, n. 12, p. 10-13.2000.

MARTINS, R.M. Breve História das Vacinações. In: FARHAT, C.K; CARVALHO, E.S; WECKX, L.Y; CARVALHO, L.H.F.R. & SUCCI, R.C.M. *Imunizações fundamentos e prática*. 4ª ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2000, cap. 01, p. 03-18.

OLIVEIRA, S.C; ROSINHA, G.M. S; BRITO, C.F.A; FONSECA, C.T; AFONSO, R.R; COSTA, M.C.M.S; GÓES, A.M; RECH, E.L & AZEVEDO, V. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Journal of medical and Biological Research. Brasil* n. 32, p. 207-214. 1999.

ORDOVÁS, K. & SCROFERNEKER, M.L. Imunidade Celular In: SCROFERNEKER, M.L & POHLMANN, P.R. *Imunologia. Básica e Aplicada*. 1ª ed, Editora Sagra Luzzatto, Porto Alegre, 1998, cap. 9, p. 153-172.

POLAND, G.A; MURRAY, D. & BONILHA-GUERREIRO, R. New vaccine development. *BMJ: British Medical Journal*. USA, v. 324, p. 1315-1319. 2002.

RAVEN, P.H. & EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 6ª ed, Editora Guanabara Koogna, Rio de Janeiro, 2001, cap. 11, p. 216-218.

ROITT, I; BROSTOFF, J. & MAL, D. *Imunologia*. 4ª ed, Editora Manole, São Paulo, SP, 1997, cap. 19, p. 19.1-19.10.

SILVA, C.L. Vacinas Gênicas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. Brasil, n. 3, p. 323-34. 1997.

SILVA, LJ. Perspectivas e avanços em vacinação. In: FARHAT, C.K; CARVALHO, E.S; WECKX, L.Y; CARVALHO, L.H.F.R. & SUCCI, R.C.M. *Imunizações fundamentos e prática*. 4ª ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2000, cap. 44, p 603-611.

SIMMERMAN, M. Advances in DNA Vaccines. *Nurse Practitioner*. USA, v. 27, p. 53-59. 2002.

SRIVASTAVA, I.K. & LIU, M.A. Gene Vaccines. *Annals of Internal Medicine*; USA, v.138, p. 550-560. 2003.

TANG, D.C; DEVIT M. & JOHNSTON A.S. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, USA, n.356, p. 152-154. 1992.

TEIXEIRA P.R. A AIDS e as iniciativas governamentais. Disponível em: <[http://boasaude.uol.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3845&ReturnCatID=59#Investimentos%20Federais%20no%20Combate%20a%20AIDS%20Superam%20US\\$%20700%20Milhões%20Anuais](http://boasaude.uol.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3845&ReturnCatID=59#Investimentos%20Federais%20no%20Combate%20a%20AIDS%20Superam%20US$%20700%20Milhões%20Anuais)>. Acesso em 28 de setembro de 2000.

TERRA. Disponível em: <<http://planeta.terra.com.br/educacao/inventabrasil/tuber.htm>>. Acesso em 05 de novembro de 2003.

UOL. Vacina gênica. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/JC/_2000/1307/cm1307a.htm>. Acesso em 05 de novembro de 2003.

WEBSTER, R.G; FYNAN, E.F, SANTORO, J.C & ROBISON H.L. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine*, USA, n. 12, p. 1495-1498. 1994.

WEINER D. B & KENNEDY. R. C. Genetic Vaccines. *Scientific American*. USA, v. 28(1), p. 50-57. 1999.

WINTER, L.M. F. & WINTER, C.E. DNA recombinante, a engenharia da vida. *Revista brasileira de tecnologia*. Brasil, v. 19, n. 2, p. 36-39. 1988.