



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
CURSO DE BIOMEDICINA

CAMILA DA SILVA GOERSCH

BIOTECNOLOGIA APLICADA ÀS VACINAS DE DNA

BRASÍLIA
2017



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
CURSO DE BIOMEDICINA

CAMILA DA SILVA GOERSCH

BIOTECNOLOGIA APLICADA ÀS VACINAS DE DNA

Trabalho de conclusão de curso apresentado em formato de artigo científico, ao UniCEUB, como requisito parcial para a conclusão do curso de Bacharelado em Biomedicina sob orientação da Profa. Dra. Anabele Azevedo Lima.

BRASÍLIA
2017

BIOTECNOLOGIA APLICADA ÀS VACINAS DE DNA.

Camila da Silva Goersch¹
Anabele Azevedo Lima²

Resumo

A vacinação visa sensibilizar o organismo contra patógenos que poderão causar alguma infecção futura. Com o avanço da biotecnologia, foi proposta a interação entre vacinas e DNA com o objetivo de gerar uma sensibilização mais segura e correta, porém, as vacinas de DNA mostraram-se pouco eficazes. Na tentativa de melhorar a sua atuação, alguns métodos biotecnológicos são sugeridos como o uso de adjuvantes e aprimoramento dos métodos de entrega do material genético. O Trabalho objetiva explicar alguns desses métodos, mostrando a sua eficácia junto às vacinas de DNA na indução da resposta imune essencial para a prevenção contra agentes externos ao organismo.

Palavras-chave: Biotecnologia, vacinas de DNA, adjuvantes gênicos, métodos de entrega de plasmídeo, eletroporação, tatuagem de DNA, ilhas CpG e STING.

Abstract

Vaccination aims to raise awareness of the body against pathogens that could cause future infection. With the advancement of biotechnology, the interaction between vaccine and DNA was proposed to generate a safer and correct sensitization, but, DNA vaccine proved to be poorly effective. In an attempt to improve their performance, some biotechnological methods are suggested, as the use of adjuvants and enhancement of genetic material delivery. This study aims to explain some of those methods, showing their effectiveness with DNA vaccines at inducing the essential immune response for prevention against external agents to the body.

Key-words: Biotechnology, DNA vaccines, genetics adjuvants, delivery methods of plasmid, electroporation, DNA tattoo, CpG motions and STING.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

² Bióloga, Doutora em Patologia Molecular – UNB, Professora de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1. INTRODUÇÃO

A vacinação teve como objetivo inicial a prevenção primária de doenças, diminuindo a morbidade e mortalidade, conseguindo erradicar algumas enfermidades (MALAGUTTI, 2011). Foi pela observação de mulheres que trabalhavam com vacas e possuíam cicatrizes nas mãos e não contraíam varíola humana, sabendo que as vacas possuíam varíola (*cowpox*), que Edward Jenner chegou à conclusão de que se podia imunizar pessoas contra aquela doença (FARHAT, 2008). Jenner em maio de 1796, inoculou material da lesão de uma fazendeira com *cowpox* em uma criança de oito anos saudável. Ela desenvolveu a forma branda da doença, e em um mês após a cura ele inoculou nessa mesma criança material biológico retirado de uma pessoa que possuía a varíola humana. A criança não foi e nem seria afetada pela doença, concluindo que a proteção gerada pela inoculação de *cowpox* foi eficaz (RIEDEL, 2005). Essa demonstração foi um marco na história da vacinação, pois ela contribuiu para a inoculação de *cowpox* na população com o objetivo de imunizar a maioria das pessoas contra a varíola. Esse tipo de prevenção é chamado de imunização ativa (MALAGUTTI, 2011).

A imunização ativa é feita pela apresentação de um patógeno ao organismo, que começa a produzir células de defesa específicas contra ele, elas têm como objetivo destruir os patógenos, gerando uma memória imunológica. A memória imunológica funciona de maneira que quando o organismo for novamente atacado por aquele patógeno, sejam produzidas células específicas de maneira mais rápida, sendo mais eficaz na eliminação dos microrganismos. O objetivo da vacinação é fazer a apresentação desses microrganismos ao corpo, que irá gerar memória imunológica, protegendo o organismo contra uma nova exposição a esses patógenos (FARHAT, 2008).

A forma que será feita a apresentação do patógeno ao organismo é devido ao tipo de vacina que será utilizada. Existem três gerações de vacinas, a primeira é com a utilização de microrganismos vivos ou atenuados; a segunda é pela introdução de toxóides, proteínas e polissacarídeos purificados ao organismo; e a terceira é conhecida como vacina de DNA ou vacinas gênicas que é a introdução de genes ou de seus fragmentos que codificam proteínas típicas do patógeno ao organismo, dessa forma expressando permanentemente a proteína exógena, a qual estimula o seu próprio sistema imune (BRAZ et al., 2014).

A biotecnologia é o mecanismo que será utilizado para a fabricação desses tipos de vacinas. Compreende-se por biotecnologia a utilização de métodos biológicos de manipulação de seres vivos na produção, conservação e desenvolvimentos de recursos naturais, com a finalidade de aumentar o desempenho dos seres vivos (TARACHI, 2016). Atualmente, as inovações de biotecnologias permitiram a criação de vacinas mais eficazes, com menos efeitos colaterais, consideradas mais seguras. Os avanços biotecnológicos estão presentes na formulação dos três tipos de gerações de vacinas, englobando novos métodos de apresentação de patógenos, novos antígenos, novos vetores, novas maneiras de realizar a imunização ativa (BRAZ et al., 2014). O objetivo do trabalho é elucidar alguns dos mecanismos que ajudam no aumento da imunogenicidade a partir de vacinas de DNA.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão de bibliografia no formato narrativo, essa forma permite uma atualização e aquisição de conhecimento sobre determinado tema, pela análise do autor de publicações em livros, revistas eletrônicas e impressas (ROTHER, 2007).

Para a realização dessa pesquisa foram utilizados artigos acadêmicos obtidos das bases de dados do SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), PubMed (*Public Medline*), Google Academics, e do acervo disponível na biblioteca do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, publicados nos últimos 10 anos (2007 a 2016). Foram, também, utilizados livros e textos mais antigos para a complementação da pesquisa. As palavras-chave usadas foram: biotecnologia, vacinas de DNA, adjuvantes moleculares, adjuvantes genéticos e métodos de entrega. Pesquisou-se as mesmas palavras separadas ou juntas, tanto em inglês como em português.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Linhas de defesa do sistema imune

O organismo humano possui três tipos de defesas contra agentes externos que podem causar algum malefício a ele. A primeira linha de defesa é a barreira física, ela é formada pelas mucosas e pele, e tem como função impedir a entrada dos patógenos ao organismo (ROITT, 2013). A segunda é o sistema imune inato, como o nome diz, nasce com o ser humano, é formado por células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), células natural killers, mastócitos, basófilos e eosinófilos. Além dessas células de defesa, possui moléculas solúveis que ajudam na resposta inata, que são o complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (CRUVINEL et al., 2010). Caracteriza-se por ser uma imunização inespecífica, ou seja, as células ligam-se de maneira rápida e aleatória a diferentes antígenos (SCROFERNEKER, 1998), não há necessidade de contato prévio com os agentes externos para que essa resposta ocorra, também não é alterada quantitativa ou qualitativamente após o contato (CRUVINEL et al., 2010).

A terceira linha de defesa do organismo é o sistema imune adaptativo. Depende de ativação de células específicas, os linfócitos, e de moléculas produzidas por eles. Caracteriza-se pela sua especificidade contra o patógeno, isso ocorre devido à capacidade dos linfócitos sofrerem mudanças em suas estruturas de reconhecimento de antígenos não próprios para destruírem os patógenos que os possuem (CRUVINEL et al., 2010). O reconhecimento estimula a proliferação e diferenciação dessas células, esse fato eleva a quantidade de linfócitos capazes de reconhecer e destruir o antígeno. A cada contato com o agente infeccioso a resposta imune adaptativa aumenta, o que é conhecido como memória imunológica, a qual gera uma resposta de memória (ROITT, 2013).

3.2 Interação entre vacinas e respostas imunológicas

O objetivo da vacinação é gerar uma resposta imune mais rápida, específica e eficaz contra determinado patógeno – resposta de memória imunológica. Para atingi-lo, as respostas imune adaptativa e inata trabalham em conjunto, sendo necessárias duas etapas, a primeira é conhecida como resposta imune primária, caracterizada pelo primeiro contato do organismo com o patógeno, e a segunda é a resposta imune secundária, caracterizada pelo contato novamente com o mesmo patógeno (ROITT, 2013).

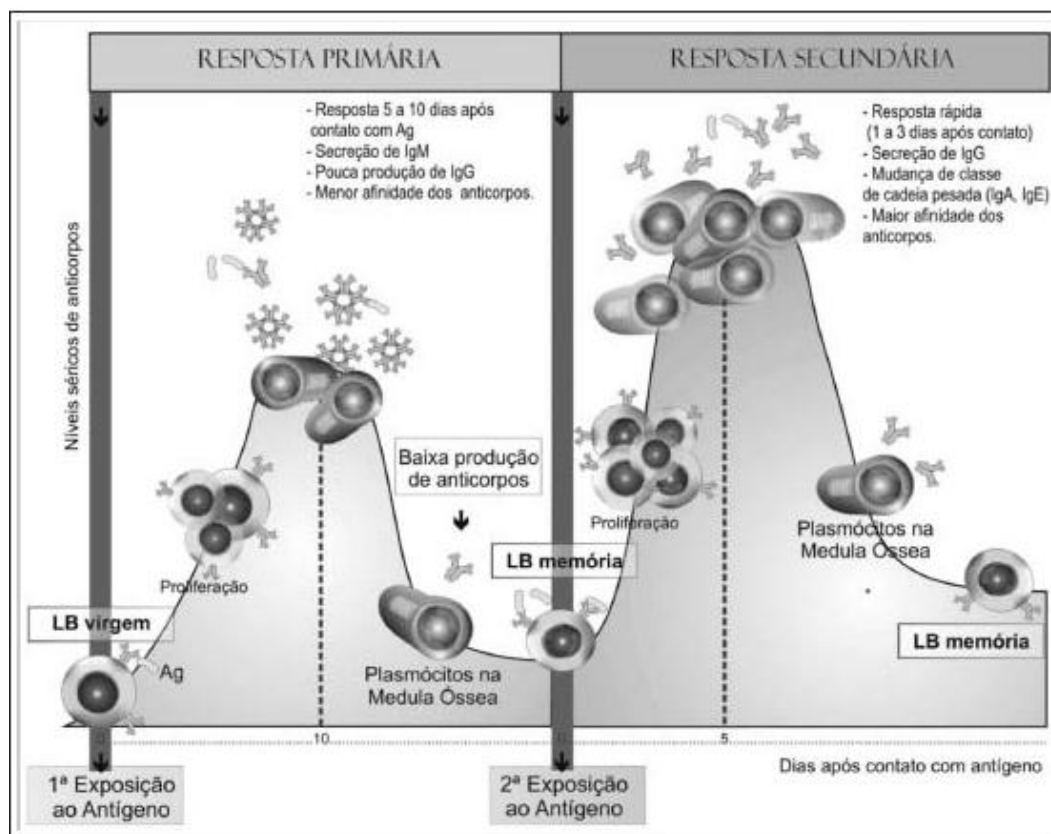
Quando o patógeno consegue entrar pela primeira vez no organismo humano, células da resposta imune inata vão ao seu encontro para destruí-los. Entre essas, existem células apresentadoras de antígenos, que ao fagocitar o patógeno, expressam uma parte

do seu antígeno em sua membrana externa. Esse será apresentado a células da resposta imune adquirida, que irão mudar a sua estrutura de reconhecimento de antígeno, para uma específica, proliferaram clones, células de memória e anticorpos específicos. A produção de anticorpos após o início da resposta começa a aumentar exponencialmente, chegando a uma fase em que não há alteração em seus níveis, chamada de platô. Logo em seguida, ocorre o declínio dos anticorpos específicos circulantes (MESQUITA, 2010).

Ao entrar em contato novamente com o patógeno, existe uma pequena população de células capazes de reconhecê-lo, pois na resposta primária houve uma produção clonal e de células de memória. Essa resposta para ocorrer necessita de uma quantidade menor de antígeno, a fase de produção é mais rápida e a exponencial é mais acentuada, ou seja, a produção de anticorpos é mais rápida e atinge níveis maiores de quantidade, a fase de platô também é alcançada mais rapidamente, possui maior duração, o declínio demora mais que a da resposta primária para ocorrer, sendo persistente (ROITT, 2013). A magnitude dessa resposta depende também do intervalo de tempo desde o contato inicial com o patógeno. Sabe-se que a resposta será menor quando o intervalo entre os dois contatos for muito curto ou muito longo, considerando o melhor momento para haver indução da resposta secundária logo após a queda de anticorpos da resposta primária abaixo do limite para detecção (MESQUITA, 2010).

Em ambas as respostas há produção de anticorpos tipo IgM e IgG, mas na resposta primária IgM é a principal imunoglobulina produzida, sendo que há uma menor e mais tardia produção de IgG. Na resposta secundária a IgG é predominante. Sabe-se que a concentração de IgM no sangue cai rapidamente, sendo observada sua queda acentuada após uma ou duas semanas, já a produção de IgG é persistente (Figura 1) (MESQUITA, 2010).

Figura 1. Níveis de anticorpos produzidos na resposta imune primária e secundária.



Fonte: MESQUITA, 2010.

3.3 Vacinas de DNA

Vacinas de DNA são definidas, segundo o FDA (Food and Drug Administration), como “formação de plasmídeos purificados contendo uma ou mais sequências de DNA capazes de induzir e/ou promover uma resposta imune contra o patógeno” (ANDERHOL et al., 2016), ou seja, vacinas de DNA são caracterizadas pela introdução de um ou mais genes codificadores de proteínas típicas do agente agressor, assim, o paciente começará a produzir de maneira permanente a proteína exógena, estimulando seu próprio sistema imune (LINDEN, 2010). O mecanismo de ação possibilita que o antígeno de interesse seja entregue ao sistema imune do paciente de maneira similar a exposição natural. Ao serem injetados no organismo do paciente os plasmídeos devem entrar no citoplasma das células, através da membrana plasmática, indo em direção ao núcleo, onde irão usar o maquinário de produção de proteínas das células do hospedeiro, dessa forma, irão dar origem às proteínas do patógeno escolhidas anteriormente. Essas proteínas exógenas,

antígenos, serão apresentadas ao sistema imune do paciente, induzindo respostas celular e humoral (COBAN et al., 2011).

As vacinas de DNA são consideradas como um método promissor contra várias doenças tanto humanas quanto animais, incluindo doenças infecciosas, câncer e alergia (GRUNWALD; ULBERT, 2014). Dentre as suas vantagens destaca-se: a segurança, pois os plasmídeos que são usados não se replicam em células eucarióticas; a rápida adaptação a variantes antigênicas, por técnicas simples de clonagem; o baixo custo do sistema de produção, amplificação e purificação; a possibilidade de vacinas combinatórias, ao misturar diferentes moléculas de DNA; a possibilidade de serem produzidas em ambientes mais quentes devido a alta estabilidade do DNA em temperaturas mais elevadas; a possível estimulação de respostas imunes celular e humoral, devido a apresentação do antígeno ao MHC de classe I e II (GRUNWALD; ULBERT, 2014). O único efeito colateral observado em humanos foi uma inflamação no local em que a injeção foi aplicada (LI; PETROVSKY, 2015).

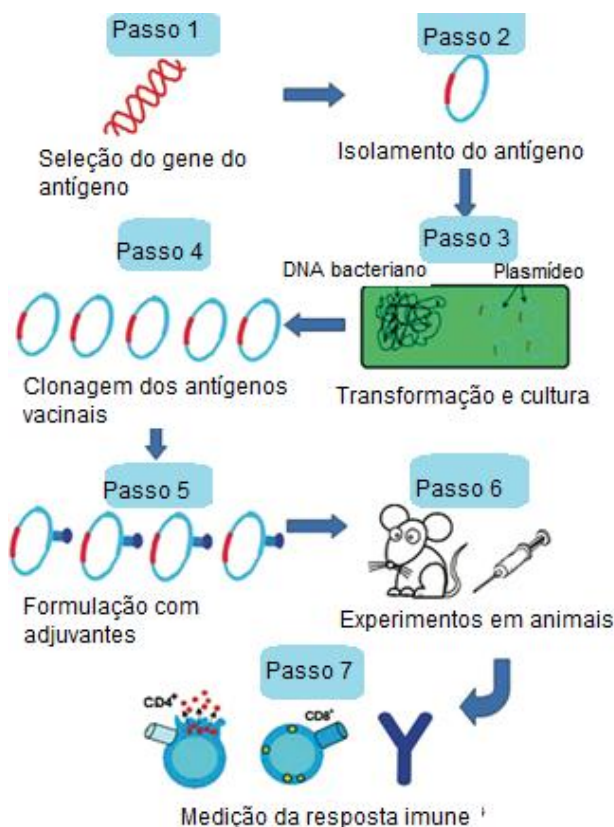
Apesar de todas essas vantagens, quando foram testadas em primatas e humanos mostrou-se uma baixa imunogenicidade, enquanto em pequenos roedores obtiveram alto nível de sensibilização. Esse fato levou pesquisadores a procurarem métodos para aumentar o poder de imunogenicidade das vacinas de DNA (GRUNWALD, ULBERT, 2014). Sendo assim, diversas estratégias estão sendo utilizadas, incluindo melhoramento do vetor, utilizar a otimização de códon, métodos para integrar o DNA nas células do hospedeiro (eletroporação, micropartículas, por exemplo), co-administração de diferentes genes que modificam o microambiente do local da vacinação (COBAN et al., 2011).

3.4 Mecanismos de aumento da imunogenicidade

Adjuvantes são utilizados para aumentar a imunogenicidade das vacinas. Eles são usados em diversas vacinas, principalmente nas que contém patógenos inativados ou antígenos de subunidade de proteínas. Os mecanismos que são utilizados para elevar a imunogenicidade podem ser por indução de citocinas específicas, diminuição no tempo de liberação do antígeno por complexos antígeno-adjuvante, ou por causar resposta da inflamação local. Dois grupos estão sendo testados com as vacinas de DNA: o primeiro, com compostos químicos que já são tecnologias consolidadas; e o segundo são adjuvantes genéticos, ou seja, proteínas codificadas pelo mesmo ou outro plasmídeo de DNA (figura

2). Métodos que aumentem a resposta imune pela entrega dos plasmídeos às células não são considerados como adjuvantes por não atuarem diretamente no sistema imune (GRUNWALD et al., 2015).

Figura 2. Produção das vacinas de DNA com adjuvantes.



Fonte: Adaptado de SHAH et al., (2014).

3.4.1 Adjuvantes genéticos

Ilhas de CpG são uma sequência de Citosina (C) com Guanina (G) não metiladas que possuem ligação fosfodiéster entre si, juntas com regiões flanqueadoras (COBAN et al., 2011). Essas ilhas estão muito mais presentes no genoma de organismos procariontes que em eucariontes, sendo que nesses últimos elas são geralmente metiladas (LI; PETROVSKY, 2015). Regiões metiladas são aquelas em que um grupamento metil é adicionado numa citosina, que normalmente é precedida por uma guanina, estão quase sempre localizadas em regiões promotoras dos genes (OLIVEIRA et al., 2010). Ao sofrer

metilação o gene é silenciado, não conseguindo ser transcrito, e conseqüentemente não traduzido (DOGRA et al., 2016). Quando bactérias invadem o organismo humano as ilhas de CpG do seu genoma ativam a resposta imune do hospedeiro, que aumenta a capacidade de eliminar o patógeno (BODE et al., 2011).

Ao descobrir a reação que as ilhas de CpG de bactérias provocam no sistema imune humano, pensou-se que poderiam usar essas para aumentar a eficácia da imunogenicidade de vacinas, dentre elas a de DNA. Estudos foram feitos e chegou-se a conclusão de que as ilhas de CpG atuam como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), esses padrões são expressos em diversos microrganismos infecciosos, e são reconhecidos pelo organismo humano por receptores como o Toll-like (TLRs) (BODE et al., 2011). Os PAMPs ativam o sistema imune inato do organismo, as ilhas de CpG, atuam como padrões moleculares associados a patógenos, sendo reconhecidos por um tipo de receptor Toll-like, o TLR9 (KLINMAN, 2006).

A ativação do sistema imune pelos procariontes é mimetizada pela utilização de oligodesoxinucleotídeo sintético (ODNs) expressando ilhas de CpG (BODE et al, 2011). CpG ODNs são rapidamente internalizadas por células imunes que possuem receptores TLR9, as principais células que expressam esse receptor são Linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides (pDCs). Ao serem ativadas, é iniciada uma cascata imunoestimulatória que termina com a maturação, diferenciação, e proliferação de células natural killer (NK), linfócitos T e macrófagos/monócitos. Também são liberadas citocinas e quimiocinas que criam um ambiente imune (KLINMAN, 2006). Por essas razões as CpG ODNs são utilizadas como adjuvantes em vacinas, elas ajudam a ativar de maneira mais eficiente o sistema imune inato, que por sua vez, irá identificar os patógenos injetados pelas vacinas (no caso da vacina de DNA será o plasmídeo), ativando o sistema imune adquirido, formando células de memória, que numa futura infecção estará apto a defender o organismo humano (BODE et al., 2011).

Acredita-se que ilhas de CpG podem aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA. Devido a sua habilidade de ajudar na liberação de Ig e citocinas, CpG em vacinas de DNA poderia contribuir com a estimulação da expressão de MHC e outras moléculas co-estimulatórias, além do efeito observado em células apresentadoras de antígenos (APCs). Ao estimular as APCs, a capacidade funcional delas aumenta, como resultado de ter melhorado a produção de linfócitos T alreativos. Porém, alguns estudos mostraram

que ilhas CpG, em vacinas de DNA, aumentam modestamente a imunogenicidade, sendo necessário mais pesquisas sobre essa relação de CpG ODNs com os plasmídeos (KLINMAN et al., 2006).

A habilidade das CpG ODNs em induzir um ambiente ideal para ativação de Th1 e auxílio para respostas TCD8+ sugere que são excelentes adjuvantes para vacinas contra o câncer. Foram feitos estudos em animais e mostrou-se que CpG ODNs aumentaram a produção de TCD8+ contra antígenos tumorais. Esse efeito foi observado quando foram usadas conjugadas à vacina ou co-administrada com o antígeno tumoral (BODE et al., 2011).

Há algumas limitações relacionadas com a segurança da administração de CpG ODNs, como a possibilidade das ODNs de aumentar a imunogenicidade de proteínas próprias do organismo no local em que foram injetadas, desencadeando o desenvolvimento de doenças autoimunes contra um órgão específico ou sistêmicas, e a probabilidade do hospedeiro ter síndrome do choque tóxico. Em relação as vacinas de DNA o problema é a de produção de auto anticorpos contra DNA de fita dupla, estudos em roedores mostraram que a quantidade de anticorpos produzidos são insuficientes para causar autoimunidade sistêmica (KLINMAN, 2006). Outra preocupação é a de promover o desenvolvimento de reações autoimunes deletérias sob certas circunstâncias. Observou-se em um estudo utilizando vacina de DNA com antígeno de *Chlamydia* juntamente com CpG ODNs em roedores que esses apresentaram miocardite autoimune, também, aumentando a suscetibilidade de intervenções que causam artrite neles (BODE, 2011).

Como explicado anteriormente sabe-se que para existir uma resposta imune inata são necessários alguns fatores, dentre eles, o Interferon. A resposta imune inata ao ser estimulada, fará o mesmo com a adquirida, sendo sua atividade essencial para a produção de uma resposta de memória. Observou-se que ao provocar um aumento na produção de Interferon tipo 1 (IFN1), esse exerce a sua função de promover a atividade de defesa das outras células, intensificando a resposta imune inata (VARELLA; FORTE, 2001).

Foi constatado que para a produção efetiva de IFN1, uma proteína chamada STING – estimulador dos genes de interferon, é necessária (ISHIKAWA et al., 2009). Ela é uma proteína transmembrana associada ao retículo endoplasmático das células e ao entrar em contato com DNA de fita dupla ativa a produção de Interferon 1. Ela é realizada

após a STING ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e fator regulador de interferon 3 (IRF3), que estimulam a produção de IFN1 (COBAN et al., 2011). Um estudo feito por Kitai et al, mostrou que a proteína STING é necessária para ativar a imunidade antitumoral respondendo ao DNA procedente de células tumorais (KITAI et al., 2017).

Esses fatos indicam que para obter maior imunogenicidade com a vacina de DNA, uma estrutura de cadeia dupla é necessária, já que para ela ocorrer é indispensável a ativação de IFN1, fazendo seu efeito de adjuvante para a proteína que será codificada (COBAN et al., 2011). Uma pesquisa realizada por Ishikawa e sua equipe concluiu ao inocular DNA de vírus da herpes 1 (HSV-1) em roedores que possuíam a proteína e em roedores que não a possuíam, que a STING é fundamental para produção eficaz de IFN1 e para a proteção eficiente contra a infecção causada pelo HSV-1. Os roedores sem a STING morriam da infecção, produzindo pouco IFN1, enquanto os portadores da proteína produziram a quantidade essencial para a sua sobrevivência. Além disso, ele enfatiza que a STING é fundamental para a defesa do hospedeiro e sua ação de adjuvante facilita o objetivo das vacinas de DNA (ISHIKAWA et al., 2009).

3.4.2 Eletroporação (EP)

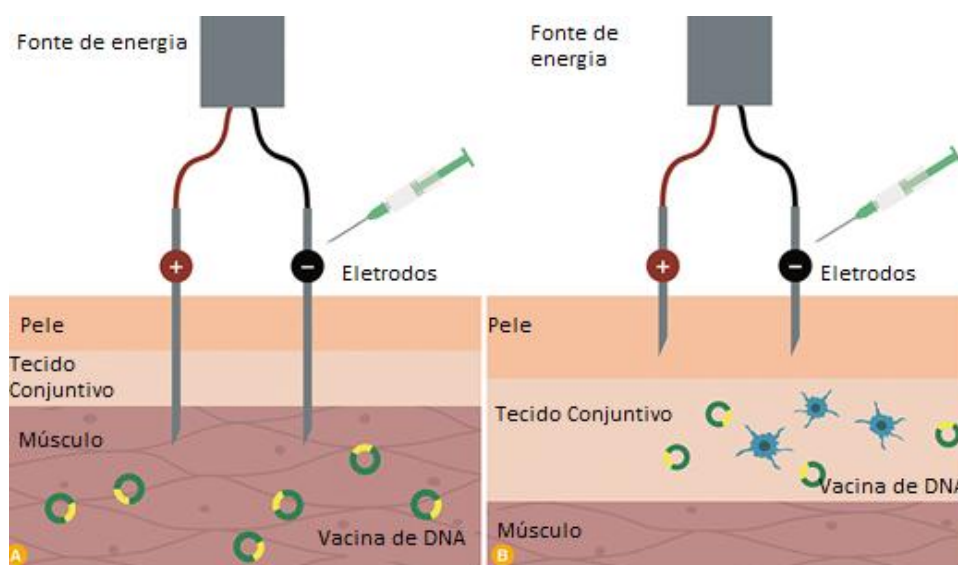
Entende-se por eletroporação (EP) como a aplicação de leves pulsos elétricos no local da vacinação após a injeção de plasmídeos de DNA. Esses pulsos promovem a formação de poros momentâneos nas membranas plasmáticas das células do local em que a vacina e a EP foram feitas. Os poros permitem a entrada de macromoléculas, como os ácidos nucleicos, no citoplasma e ao pararem os pulsos elétricos, os poros fecham-se, aprisionando as macromoléculas dentro da célula (FLINGAI et al., 2013). O mecanismo de como os plasmídeos entram nas células pelos poros ainda não está bem esclarecido, acredita-se que seja ou por difusão passiva ou por facilitação eletroferética (SARDESAI; WEINER, 2011). Apesar desse mecanismo não estar bem elucidado, é comprovado que com a eletroporação há maior entrada de plasmídeos nas células do que quando a vacina é feita sozinha (FLINGAI et al., 2013).

A Eletroporação não apenas melhora a entrada dos plasmídeos nas células como aumenta a distribuição do DNA pelo tecido e causa reação inflamatória local, contribuindo dessa forma para uma resposta imunológica mais forte (FLINGAI et al., 2013). Experimentos de vacinas antigênicas, com e sem a utilização de eletroporação,

foram feitos e mostrou-se que com a EP há um aumento muito maior na resposta imune celular e humoral, mesmo em baixas doses (SARDESAI; WEINER, 2011).

A EP pode ser realizada tanto com vacinas de DNA intradérmicas (ID EP) quanto intramusculares (IM EP) (Figura 3). A pele possui muitas células apresentadoras de antígenos, como as células de Langherhans (na epiderme) e células dendríticas (na derme). Essas células garantem a imunogenicidade da vacina intradérmica, pois sabe-se que são necessárias para gerar uma boa resposta imune (GRUNWALD et al., 2015). A vacinação intradérmica possui a vantagem de gerar menos desconforto para o paciente, uma vez que para os pulsos serem aplicados serão necessárias pequenas agulhas, e é possível a aplicação de anestésicos tópicos no local da injeção (ROOS et al., 2009).

Figura 3. Comparação entre vacinas de DNA com eletroporação intramuscular (A) e intradérmica (B).



Fonte: Adaptado de GRUNWALD; ULBERT (2014).

A vacinação com eletroporação intramuscular gera um maior desconforto ao paciente, pois é necessário que as agulhas cheguem ao tecido muscular, tanto as que irão gerar as ondas elétricas, quanto as da aplicação dos plasmídeos. Quando o pulso elétrico é feito, o músculo em que as agulhas estão localizadas contrai-se, causando um pequeno incomodo (ROOS et al., 2009). Experimentos mostraram que células musculares (miócitos) maduras expressam a proteína codificada pelo plasmídeo injetado por meses, enquanto em outras células, por apenas poucos dias. Dessa forma, provou-se que a IM EP

é mais eficaz na estratégia de entrada do plasmídeo na célula (GRUNWALD et al., 2015). Por esse fato a maioria dos estudos feitos até hoje são conduzidos pela injeção intramuscular, mas, recentemente, estão focando no desenvolvimento da intradérmica para complementar o sistema de entrega de plasmídeos ao músculo (SARDESAI; WEINER, 2011).

Apesar desses benefícios da eletroporação, surgiram algumas preocupações com o fato de estar desestabilizando momentaneamente algumas células do organismo. Problemas como se a EP poderia aumentar a persistência do DNA e uma maior frequência de integração foram questionados, mas, felizmente, nenhum dado foi publicado afirmando o aumento da persistência do plasmídeo no organismo e integração dele na célula transfectada (ROSS et al., 2009). Também não há aumento no risco de toxicidade para o paciente, sendo o efeito adverso mais relatado em ensaios clínicos a dor no local de aplicação da EP (FLINGAI et al., 2013).

Um exemplo de uso da eletroporação é a geneterapia em porcos, em janeiro de 2008, foi licenciada na Austrália uma vacina com a utilização de EP. Ela é feita pela injeção intramuscular de plasmídeo que codifica o hormônio liberador de hormônio do crescimento – GHRH (LifeTide-SW5), utilizado apenas uma aplicação com a eletroporação (PLUMBLINE LIFE SCIENCE, 2016). O sucesso dessa vacina na veterinária sugere que com algumas adaptações será possível seu uso para tratamento em doenças humanas (KUTZLER; WEINER, 2015).

A combinação de vacinas de DNA com a eletroporação, aumenta de maneira eficaz a resposta imunogênica, induzindo respostas celular e hormonal, podendo ser comprovado por diversos estudos. Um desses mostrou que houve indução de células TCD8+ específicas contra HPV, essas células possuíam excelente resposta citolítica contra o vírus do papiloma humano (HPV) 16/18, gerada pela vacina de DNA seguida de EP. Além disso, todas as mulheres vacinadas nesse estudo foram soroconvertidas com alta titulação de antígenos (FLIGAI et al., 2013). Esse método é seguro, sendo necessário os mesmos cuidados que são utilizados em vacinas de primeira e segunda geração, como a maneira de fazer a injeção (intradérmica, intramuscular), dose, formulação (SARDESAI, WEINER, 2012).

3.4.3. Tatuagem de DNA (DNA Tattooing)

O plasmídeo pode ser injetado ao paciente por perfurações repetidas feitas na derme pelo aparelho de tatuagem. Esse processo é invasivo e ao ser realizado fere a pele, causando inflamação seguida de cicatrização (POKORNA et al., 2008). Ao sofrer um trauma as células que constituem a epiderme emitem sinais que ativam e recrutam células do sistema imune inato e adquirido para o local do ferimento (NESTLE et al., 2009).

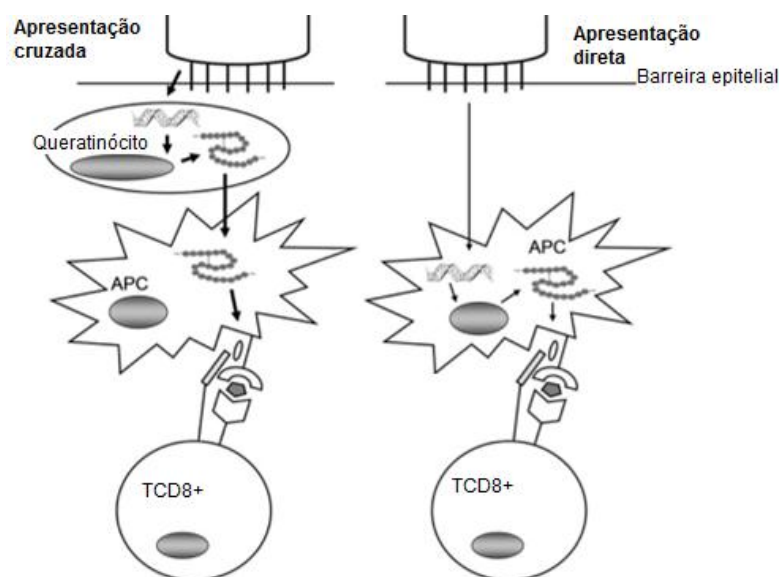
A pele é rica em células apresentadoras de antígenos (APCs), logo, ela é muito bem equipada para realizar a defesa do organismo (NESTLE et al., 2009). Estudos mostraram que as principais células transfectadas com os plasmídeos (via tatuagem de DNA) são os queratinócitos, sendo que as que foram recrutadas devido ao processo de inflamação estarão em maior quantidade no local da tatuagem, tornando mais eficaz e rápido o processo de reconhecimento das proteínas exógenas produzidas do plasmídeo. Portanto, o processo de tatuagem não só ajuda no aumento da transfecção dos plasmídeos para os queratinócitos, como também possui um efeito adjuvante devido a inflamação cutânea (OOSTERHUIS et al., 2010).

Apesar de a maioria das células transfectadas serem os queratinócitos, algumas células apresentadoras de antígenos (cerca 1% do total de células transfectadas, segundo Oosterhuis et al., 2010) também podem sofrer esse processo. Dessa forma, há duas rotas de possível transfecção e apresentação dos antígenos aos linfócitos TCD8+. A primeira é inicializada pela transfecção do queratinócito, o qual produz a proteína exógena, ela sai da célula, é adquirida pelas APCs, sofre apresentação cruzada ao linfócito TCD8+. A segunda é na APC, o plasmídeo já dentro dela é traduzido e há a apresentação da proteína exógena ao linfócito TCD8+ de maneira direta (Figura 4) (OOSTERHUIS et al., 2010).

Aumentar o tamanho da agulha, a concentração de plasmídeos e a área de aplicação da tatuagem foram algumas propostas feitas e testadas para otimizar a técnica. Foi constatado que o aumento da agulha não influencia significativamente no aumento da expressão do antígeno, já que as principais células que são transfectadas estão na epiderme. O aumento na concentração de DNA, eleva a tradução dos plasmídeos, consequentemente aumentando a apresentação dos antígenos e a imunogenicidade (VAN DEN BERG et al., 2008). A aplicação da tatuagem em uma maior área do corpo, faz com que mais células sejam transfectadas, amplificando a expressão gênica. Esse último fato é uma vantagem sobre a injeção intradérmica (POKORNA et al., 2008).

A tatuagem de DNA mostrou-se muito eficiente no seu objetivo, transfectar as células aumentando a imunogenicidade. Pokorna et al., em 2008 fez um estudo comparando injeção intramuscular administrada com adjuvantes químicos com tatuagem de DNA, foi indicado que a tatuagem provoca respostas imune humoral e celular mais fortes e mais rápidas que a intramuscular (POKORNA et al., 2008). É válido afirmar que a técnica é promissora, tendo como ponto negativo o procedimento ser dolorido. As vantagens são muitas, é uma técnica barata, gera resposta imune mais acelerada e intensa, sendo necessário apenas encontrar a concentração certa de plasmídeos para cada paciente (OOSTERHUIS et al., 2010).

Figura 4. Possíveis rotas de apresentação de antígeno à linfócitos TCD8+.



Fonte: Adaptado de OOSTERHUIS et al. (2009).

3.4.4. Nano e

micropartículas para entrega de DNA

Ao entrar no organismo, os plasmídeos que não são transfectados podem sofrer degradação pelas nucleases. Para diminuir a degradação e aumentar a eficácia na entrega dos plasmídeos às células, nano e micropartículas revestindo o DNA foram propostas. A diferença entre os tamanhos dessas moléculas é o que as classifica, e ele influencia nas

suas atividades dentro do organismo (FARRIS et al., 2016). Micropartículas são aquelas que estão na faixa de tamanho de 10^{-6} e nano são as que estão na faixa de 10^{-9} (BIPM, 2017).

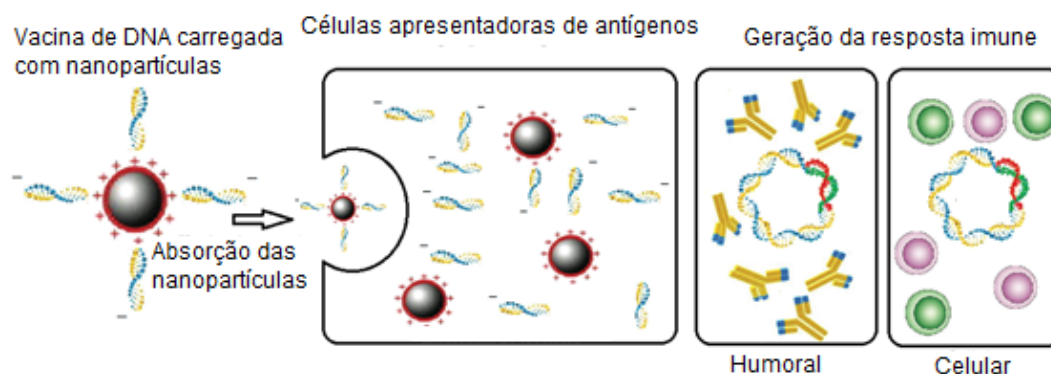
As micropartículas são fagocitadas por células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente os macrófagos. Essa preferência das APCs pelas micropartículas é devido ao seu tamanho, foi constatado que as partículas com tamanho entre 1 e $10\mu\text{m}$ são fagocitadas com maior facilidade que as maiores, sendo que o tamanho ideal é menor que $2\mu\text{m}$ (O'HAGAN et al., 2004, FARRIS et al., 2016).

Tanto as micro como nanopartículas ao serem injetadas no organismo, se estiverem em concentração suficiente, vão desencadear resposta inflamatória aguda seguida de inflamação crônica com a presença de linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Com a aplicação local, há a criação de reservatório de partículas, quanto maiores elas forem mais intensa será a sua formação (KOHANE, 2007). As micropartículas ao serem usadas com os plasmídeos, geram um depósito de DNA, sustentando a sua exposição às células (FARRIS et al., 2016).

As nanopartículas por serem menores que as micro sofrem fagocitose e pinocitose (feita por todos os tipos de células) (KOHANE, D., 2007). Elas são preferência das células dendríticas e possuem um nível de transfecção maior que o das micropartículas (FARRIS et al., 2016). Dentro das células apresentadoras de antígenos, as dendríticas são as mais eficientes, esse fato explica o porquê das nanopartículas proporcionarem o maior aumento da imunogenicidade e também porquê elas conseguem alcançar mais rapidamente os linfonodos (SINGH, et al., 2007).

A administração de nanopartículas e/ou micropartículas com os plasmídeos, induz resposta imune celular e humoral (figura 5). As partículas escolhidas para esse trabalho são as que possuem alta biocompatibilidade e biodegradabilidade (FARRIS et al., 2016). Exemplo de micropartícula usada em vacinas de DNA é PLGA – poli (ácido lático-co-ácido glicólico), um polímero biodegradável e biocompatível (SINGH et al., 2000). Apesar da PLGA aumentar a resposta imune, durante o processo de encapsulamento do plasmídeo com a PLGA, o DNA pode sofrer degradação o que resulta em baixa expressão gênica (FARRIS et al., 2016).

Figura 5. Geração da resposta imune por nanopartículas com a vacina de DNA.



Fonte: Adaptado de SHAH et al. (2014).

Um tipo de nanopartícula que já foi aprovado para uso farmacêutico em humanos e que agora está sendo estudada para sua utilização com vacinas de DNA é a nanopartícula lipídica sólida (SLN). Ela é composta de matriz sólida que é capaz de proteger o ativo biológico, no caso o DNA plasmidial, contra degradação e é possível modular o tempo de liberação dele. A SLN foi testada em células de câncer do pulmão, liberando o gene p53, observou-se que ela possui potencial para aplicação clínica e é eficaz na indução de apoptose e na inibição do crescimento tumoral (SHAH et al., 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de métodos mais seguros para sensibilizar o organismo, com poucas reações adversas, fez com que o mundo científico colocasse sua atenção nas vacinas de DNA. Houve muita certeza na geração da resposta imunológica tanto para a prevenção quanto para a profilaxia e cura de doenças até então consideradas incuráveis. Quando observou-se que não havia a imunogenicidade esperada, métodos para aumentá-la foram e estão sendo propostos.

Diante do exposto, é possível considerar que com aprimoramento nos métodos de entrega dos plasmídeos e adjuvantes, a vacina de DNA forte e eficaz está muito perto de ser alcançada. Devendo focar a atenção em entender como o sistema imunológico

funciona e quais mecanismos devem ser salientados para aumentar a imunogenicidade sem causar danos ao organismo humano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERHOLM, et al. Cytomegalovirus Vaccines: current status and future prospects. **Drugs**, Germany. v. 76, n. 17, p. 1625-1645, Nov. 2016.

BODE, C. et al. CpG DNA as a vaccine adjuvante. **Expert Review Vaccines**, United Kingdom, v. 10, n. 4, p. 499-511, Abr. 2011.

BOTELHO, L., CUNHA, C., MACEDI, M. O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. **Revista Gestão e Sociedade**, Belo Horizonte. v. 5, nº5, p. 121 – 136, Maio/Ago. 2011.

BRAZ, L. et al. Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. **Revista Saúde & Ciência online**, Campina Grande v. 3, n.3, p. 189-206, Mar. 2014.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES – BIPM. Measurement units: The SI. France, 2017. Disponível em: <http://www.bipm.org/en/measurement-units/>. Acesso em: 02, junho, 2017.

COBAN, C. et al. Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. **Current gene therapy**, Sharjah, v. 11, n. 6, p. 479-484, Jun. 2011.

CRUVINEL, W. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447. Ago. 2010.

DOGRA, P. Et al. Generating long-lived CD8+T-cell memory: insights from epigenetic programs. **European Journal of Immunology**. United Kingdom, v. 46, n. 7, p.1 548–1562, Jul. 2016.

FARHAT, C., WECKX, L., CARVALHO, L., SUCCI, R., **Imunizações, fundamentos e prática**. 5º ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FARRIS, et al., Micro and nanoparticles for DNA vaccine delivery. **Experimental biology and medicine**, Maywood, v. 241, n. 9, p. 919 – 929, Maio. 2016.

FLINGAI, S. et al, Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. **Frontiers in immunology**, Switzerland, v. 4, p. 1-10, Nov. 2013.

GRUNWALD, T., ULBERT, S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. **Clinical and experimental vaccine research**, Seoul, v. 4, n. 1, p. 1-10, Abr. 2015.

ISHIKAWA et al. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, United Kingdom, v. 461, n. 7265, p.788-792, Out. 2009.

KITAI et al. DNA-Containing exosomes derived from cancer cells treated with Topotecan activate a STING-dependent pathway and reinforce antitumor immunity. **The journal of immunology**, United Kingdom, v. 198, n.4, p.1649-1659, Fev. 2017.

KLINMAN, D. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. **International Reviews of Immunology**, United Kingdom, v. 25, p. 135-154, Out. 2006.

KOHANE, D. Microparticles and Nanoparticles for drug delivery. **Biotechnology and Bioengineering**, Manhattan, v. 96, n. 2, p. 203 – 208, Fev. 2007.

KRIEG, A. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 709-760, Ago. 2002.

LI, L., PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 3, p. 313-329, Mar. 2016.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31-69, Jan. 2010.

MALAGUTTI, W. **Imunização, imunologia e vacinas**. Rio de Janeiro: Editora Rubio Ltda, 2011.

MESQUITA, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552-580, Out. 2010 .

MINIGO, et al., Poly-L-lysine-coated nanoparticles: a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. **Vaccine**, The Netherlands, v. 25, n. 7, p. 1316-1327, Jan. 2007.

NESTLE, et al., Skin immune sentinels in health and disease. **Nature reviews immunology**, United Kingdom, v. 9, n. 10, p. 679-691, Out. 2009.

O'HAGAN, et al., Microparticles for the delivery of DNA vaccines. **Immunological Reviews**, Denmark, v. 199, p. 191 – 200, Jun. 2004.

OLIVEIRA, N. Et al, 2010. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Brasil, v. 56, n. 4, p. 493-499, Set. 2010.

OOSTERHIUS, et al., DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing. **Current topics in microbiology and immunology**, Berlin, v.351, p. 221-250. Nov. 2010.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: ARTMED Editora Ltda, 2001.

PLUMBLINE LIFE SCIENCE. **Life tide sw5**. Coreia, 2016. Disponível em: <http://www.eng.plumblines.com/lifetide-sw-5>. Acesso em: 19, maio, 2017.

POKORNA, et al., DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. **Genetic vaccines and therapy**, v. 6, n.4, p. 1-8, Fev. 2008.

QUADROS, C. A. **Vacinas, prevenindo a doença, protegendo a saúde**. São Paulo: Editora ROCA Ltda, 2008.

ROITT, I. M. et al. **Fundamentos de imunologia**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.

SARDESAI, N. WEINER, D. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. **National institutes of health**, Bethesda, v. 23, n. 3, p. 421-429, Jun. 2011.

SCROFERNEKER, M. POHLMANN, P. **Imunologia, básica e aplicada**. 1^a ed. Porto Alegre: Editora Sagra Luzzatto, 1998.

SHAH, et al., Nanoparticles for DNA vaccine delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 10, n. 9, p. 2332 – 2349, Set. 2014.

SINGH, et al., Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems, **Future drugs**, United Kingdom, v. 6, n. 5, p. 797 – 808, Out. 2007.

TARICHI, A. Modelos de referência para desenvolvimento de novos produtos para pesquisas futuras no setor de biotecnologia. **Revista UNIFEV: Ciência & Tecnologia**, Votuporanga, v. 1, n. 1, p. 146-157, Jan. 2016.

VAN DEN BERG, et al., Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. **Human gene therapy**, The Netherlands, v. 20, n. 3, p. 181-189, Mar. 2009.

VARELLA, P. FORTE, W. Citocinas: revisão. **Revista brasileira alergologia imunopatologia**, São Paulo, v. 24, p. 146-154, Jul./Ago. 2001.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Baylor University Medical Center Proceedings – BUMC Proceedings**, v. 18, p. 21 – 25, Jan. 2005.