



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE - FACES

GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JEFERSON LUIZ DE JESUS SIQUEIRA

**ENGENHARIA GENÉTICA E A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE
NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS GÊNICAS**

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. Orientador: Prof. Dr. Paulo
Roberto Queiroz.

BRASÍLIA – DF

2017

Engenharia genética e a tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas gênicas.

JEFERSON LUIZ DE JESUS SIQUEIRA*,

PAULO QUEIROZ**

Resumo

A tecnologia do DNA recombinante tem um papel extremamente fundamental na área da vacinação, já que para o desenvolvimento das vacinas gênicas, as técnicas moleculares ajudaram a retirada de genes patogênicos de microrganismos e introduzi-los em vetores de transferência para posteriormente serem expressos a fim de se obter antígenos imunostimulatórios, assim como outras técnicas dentro dessa mesma tecnologia que buscam o mesmo resultado, apresentar o antígeno de forma eficiente para o organismo, sendo a partir de genes ou de partículas viróticas (como capsídeos) bacterianas (plasmídeos) e parasitárias (proteínas de membrana). A produção das vacinas gênicas, é uma tecnologia promissora para a prevenção e controle de doenças tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. O trabalho exposto tem como objetivo, relacionar os conceitos da tecnologia do DNA recombinante na produção de vacinas gênicas, como por exemplo, a vacina da Esquistossomose e a vacina quimérica da Dengue, que foram desenvolvidas recentemente.

Palavras-chave

Vacina de DNA, vacina gênica, engenharia genética, recombinação genética, tecnologia do DNA recombinante, edição genética, imunização.

Abstract

Recombinant DNA technology plays an extremely large role in the field of vaccination, since for the development of DNA vaccines, molecular techniques have helped to remove pathogenic genes from microorganisms and to introduce them into transfer vectors for later expression immunostimulatory antigens, as well as other techniques within the same technology that seek the same result, present the antigen efficiently to the organism, being from bacterial (plasmids) genes and viral (like capsids) particles and parasites (membrane proteins). The production of DNA vaccines is a promising technology for the prevention and control of diseases in both human medicine and veterinary medicine. The objective of the present work is to relate the concepts of recombinant DNA technology to the production of gene vaccines, such as the Schistosomiasis vaccine and the chimeric Dengue vaccine, which were recently developed.

Keywords

DNA vaccine, gene vaccine, genetic engineering, genetic recombination, recombinant DNA technology, genetic editing, immunization.

1. Introdução

Segundo Barbosa e colaboradores (2012) a engenharia genética permitiu a manipulação do genoma de microrganismos vivos que levaram cientistas a esclarecerem ainda mais as dúvidas da estrutura do DNA. Posteriormente, tal área possibilitou o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante permitindo não só a clonagem de vetores mas também de enzimas de restrição, que permitiram cortar o DNA em pontos específicos os quais, isolados, formam fragmentos que podem ser utilizados para diversas aplicações como, por exemplo, a retirada do gene responsável pela evolução de uma doença em um indivíduo ou na expressão desses genes para uma possível imunização.

De acordo com Castelo e colaboradores (2004) com a engenharia genética foi possível a criação de técnicas que ajudaram a construir combinações de genes capazes de codificar novos fármacos, como as vacinas gênicas e, com a utilização dessa tecnologia, foram feitas novas vacinas com efeitos menos patogenômicos, com baixo risco de infecções ou rejeição imunológica a partir da própria vacina, assim como,

efeitos com uma alta eficiência na produção de anticorpos necessários para imunização de certas doenças, uma vez que, algumas vacinas apresentam efeitos adversos indesejados.

Para a vacinação, existem várias vias que podem ser administradas, como a intranasal (na forma de aerossol), a via oral, por via intradérmica (por bombardeamento de micropartículas de ouro revestidas de material genético) e a intramuscular, sendo a mais utilizada por ser um processo simples e que apresenta baixo custo, porém quando realizada, sua composição requer uma quantidade alta de plasmídeo para estimular adequadamente a resposta imune, uma vez que, precisam atingir o núcleo da célula. Por isso, na composição dessas vacinas necessita-se uma grande quantidade de moléculas de plasmídeo para garantir que a proteína será expressa (BARBOSA et al., 2012).

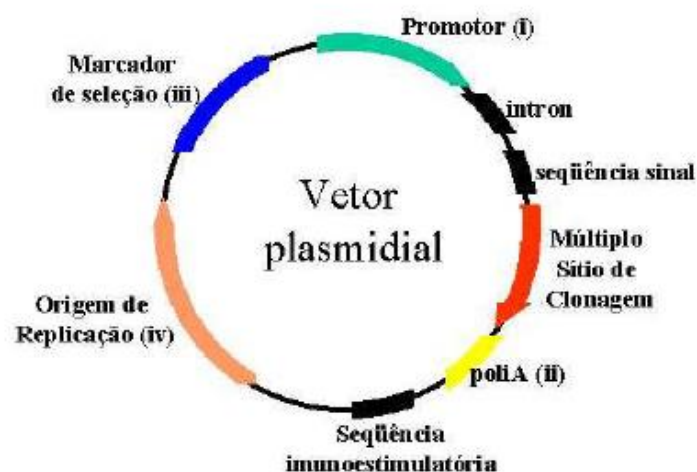
Os plasmídeos, demonstrado na Figura 1, são pequenas moléculas de DNA, dupla fita, que variam de 5 a 400 kilobases (kb) e que contém elementos necessários para a replicação de um gene e são bastante utilizados para a clonagem por apresentarem uma facilidade de manuseio além de extrema eficácia para a expressão de genes, o que justifica a sua utilização em técnicas recombinantes. Além disso, combinando-se os plasmídios com as enzimas de restrição é possível clivar tanto o gene de interesse a ser introduzido no plasmídeo, quanto o próprio plasmídeo para conseguir inserir o gene estudado e, assim, gerar a sua replicação (LINDEN, 2010).

As enzimas de restrição proporcionaram técnicas que auxiliaram para cortar o DNA em pontos pré-definidos, permitindo isolar fragmentos de ácido nucléico e introduzi-los no genoma de um organismo hospedeiro juntamente com a utilização da reação de polimerização em cadeia (PCR), uma vez que, essa técnica permite amplificar em quantidade os fragmentos de DNA que serão clonados (BARBOSA et al., 2012).

As primeiras vacinas foram produzidas tanto de microrganismos vivos e atenuados quanto de vacinas de microrganismos mortos e inativados; porém, com o passar do tempo e o avanço da ciência foi possível obter novos antígenos, assim como, a forma de apresentá-los para as células do sistema imunológico por meio de novas técnicas que contribuiriam para a introdução de fragmentos de genes ou de genes que apresentam capacidade de codificar antígenos e potencializá-los imunogenicamente, tornando-os mais eficazes contra infecções (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Segundo Kano e colaboradores (2007) a vacina gênica apresenta uma ação preventiva bastante eficaz, uma vez que, consiste basicamente em introduzir um gene no organismo do indivíduo o qual induzirá a resposta imune humoral e celular, buscando ativar tanto a resposta dos linfócitos T CD4+ quanto a dos T CD8+, porém sem a presença de um microrganismo vivo, o que corrobora para uma baixa patogenicidade da vacina; para a criação dessas vacinas gênicas é necessário: o promotor de expressão para as células de mamíferos, sinal de poliadenilação (PoliA), um marcador de seleção e o sítio no qual será inserido o gene de interesse.

Figura 1. Vetor plasmidial utilizado na clonagem molecular para a obtenção de DNA recombinante.



Fonte: Glenting; Wessels (2005).

Quando são utilizados plasmídios que possuem uma função promotora forte, irá induzir a expressão de altos níveis protéicos nas células eucarióticas o que é melhor para o sistema imunológico do indivíduo e, conseqüentemente, para a vacina (Kano et al. 2007).

Com a CRISPR/Cas9 foi possível eliminar genes os quais a expressão causaria patogenicidade e impedir que ocorra a doença; com tal auxílio não só as vacinas serão eficazes, mas também, novas técnicas, meios de induzir a imunidade no indivíduo, até mesmo melhorar as vacinas já utilizadas anteriormente (FOK et al., 2015).

Mesmo tendo uma alta potencialidade de imunização, as vacinas gênicas ainda estão sendo fortemente estudadas pelo fato de tal imunização ainda depender também de fatores como a seleção do gene alvo, da via que será aplicada, frequência e dosagem, vetores a serem expressos, assim como, na saúde, idade dos animais que foram testados (DINIZ; FERREIRA, 2010).

A partir do exposto, o objetivo desse trabalho foi relacionar os conceitos da tecnologia do DNA recombinante na produção de vacinas gênicas.

2. Metodologia

Foi realizada uma revisão de literatura narrativa, onde foi feito um levantamento na base de periódicos nacionais e internacionais para constituir uma análise crítica e pessoal do autor para discutir o desenvolvimento de um determinado assunto (ROTHER, 2007). Na elaboração desse trabalho foram utilizados artigos científicos publicados entre 2004 a 2016 nas bases de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Google Acadêmico, nas línguas Espanhol, Inglês e Português. Para isso foram utilizadas as palavras-chave: Vacina de DNA, vacina gênica, engenharia genética, recombinação genética, tecnologia do DNA recombinante, edição genética, imunização.

3. Desenvolvimento.

O que é imunização?

Imunização é o termo utilizado quando um organismo cria um mecanismo de defesa contra um agente infeccioso ou alérgico, vírus, bactérias, protozoários, dentre outras substâncias ou organismos presentes na natureza ou, até mesmo, produzidas pelo próprio ser humano (ROITT; DELVES, 2013).

A imunidade refere-se quando nosso organismo apresenta uma proteção após entrar em contato com o microrganismo ou macromoléculas presentes no meio ambiente, gerando uma resposta imune humoral e celular, como foi observado primeiramente em 1978, por Edward Jenner, quando observou os pacientes com varíola. Com o passar do tempo, diversas pesquisas foram realizadas até afirmarem que a imunidade pode ser adquirida de forma passiva ou ativa, sendo a passiva, natural quando ocorre a transferência de anticorpos pelo leite materno e a artificial a partir da

soroterapia, a imunidade ativa também é subdividida em natural, quando o organismo entra em contato com o patógeno e a artificial, por meio da vacinação, que gera uma memória imunológica, sendo traduzida por uma proteção em sua maioria, por um longo período (ROITT, DELVES, 2013).

A resposta imune promove a proteção do organismo a partir de duas respostas, inata e adaptativa, sendo a resposta imune inata caracterizada por não apresentar uma resposta específica e não gerar células de memória imunológica contra um patógeno, ocorrendo apenas durante o primeiro contato do organismo com o antígeno, envolvendo macrófagos, monócitos e neutrófilos, células fagocitárias, enquanto a resposta imune adaptativa acontece na tentativa de eliminar o patógeno que passou pela resposta inata, gerando, assim, células efectoras antígeno-específico, como os linfócitos T e B, principalmente, os quais reconhecem especificamente os diferentes determinantes antigênicos (KANO; VIDOTTO; VIDOTTO, 2007).

Surgimento das vacinas

O surgimento da vacina aconteceu durante a epidemia de varíola, onde eram inoculados pus seco das lesões da doença nos indivíduos sadios apesar de não ser aceita no Ocidente tal técnica foi empregada por diversos países do mundo aproximadamente no ano de 1700 até relacionarem que tal inoculação tinha pouco efeito naquelas pessoas que já haviam contraído a varíola bovina e após grandes pesquisas nesse ramo, foi criada a vacina da varíola a partir de material bovino (PEREIRA, 2003).

Segundo DINIZ; FERREIRA (2010) as vacinas foram classificadas em três grupos baseadas em antígenos vacinais e no princípio ativo, classificando-as em primeira, segunda e terceira geração, sendo as vacinas de primeira geração, formadas a partir de patógenos inativados ou atenuados para reduzir a ação desses microorganismos, levando o sistema imune a adquirir informação suficiente para produzir anticorpos contra a infecção, também eram utilizados antígenos de patógenos semelhantes para ajudar no controle de algumas doenças como, por exemplo, as vacinas para imunização contra o vírus da varíola, obtidas a partir de vírus isolados em bovinos, e a da tuberculose, a partir de uma bactéria também obtida em bovinos, as de segunda geração, que são vacinas acelulares compostas por fragmentos do microrganismo e a de

terceira geração, realizada a partir da informação genética e com o auxílio da clonagem, introduzir o DNA plasmidial no organismo ou

Vacinas de 1ª geração

Com o avanço da biotecnologia, foi possível desenvolver vacinas a partir de novos antígenos, proteínas e vetores, proporcionando uma qualidade vacinal mais eficiente quando comparadas às anteriores, de primeira e segunda geração. Justamente por serem mais eficazes podem ser produzidas a partir da manipulação genética, podendo obter proteínas recombinantes que ajudam na apresentação para o sistema imunológico do organismo sem que traga efeitos adversos ou, pelo menos, diminuídos (CASTELO et al., 2004).

As vacinas de primeira geração foram utilizadas por vários anos e muitas delas são utilizadas até hoje, sendo a sua aplicação muito eficiente na prevenção de doenças infecciosas, mesmo apresentando um certo risco de reversão do agente enfraquecido, ajudaram a salvar milhões de pessoas contra inúmeras doenças, como foi o caso das vacinas da febre amarela, sarampo, caxumba, rubéola, varicela zoster e a vacina bacteriana da tuberculose (BCG) (BISETTO, CLOSAK, 2017).

No caso das vacinas atenuadas, apresentam como a sua principal vantagem, a maior durabilidade da imunidade no corpo do indivíduo, já que o agente infeccioso está ali presente porém enfraquecido, sendo um processo relativamente barato e simplificado porém, sua principal desvantagem seria o armazenamento, já que o agente está vivo. A vacina deve ser mantida em baixas temperaturas e manter um pH estável além do fato de que pessoas imunocomprometidas apresentam uma chance do agente atenuado causar alguma infecção, sendo muitas delas consideradas perigosas, como a da Febre Amarela (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As vacinas que são compostas por agentes inativados, não podem se multiplicar no corpo da pessoa, tendo como principal vantagem a segurança e mais estável em variação de temperatura, já que não terá a multiplicação do agente, não correrá o risco do mesmo infectar o indivíduo com a doença o que leva a sua principal desvantagem, a

imunidade passageira, onde é necessário, na maior parte, a aplicação de várias doses para que o indivíduo possa adquirir uma resposta imunológica adequada para combater a doença e, em alguns casos, é necessário um reforço dessas doses para que o indivíduo venha a ter um estímulo na resposta imunológica, como a vacina anti-rábica (ROITT; DELVES, 2013).

Vacinas de 2ª geração

As vacinas de segunda geração surgiram após a percepção de que algumas vacinas poderiam ser formadas a partir da indução de anticorpos como, por exemplo, as toxinas que, quando expressas são responsáveis pelos sintomas da doença, ou açúcares de superfície, os quais são apresentados ao sistema imune, neutralizando as bactérias que possivelmente iriam se multiplicar rapidamente no organismo infectado (KANO; VIDOTTO; VIDOTTO, 2007).

Ainda, dentro do grupo da segunda geração existem as vacinas acelulares, compostas de toxinas purificadas e inativas quimicamente, proteínas e polissacarídeos purificados, como é o caso da vacina antitetânica, antidiftérica, e as vacinas para o controle de meningite meningocócica e da pneumonia (CASTELO et al., 2004).

Essas vacinas induzem uma boa resposta imune humoral apenas com partículas dos agentes, sem a necessidade do microrganismo inteiro, sendo essa sua principal vantagem; porém, as técnicas que são utilizadas para obter esses fragmentos apresentam um custo elevado para a produção em larga escala (GLENTING; WESSELS, 2005).

Vacinas de 3ª geração

Na década de 1990 foram descobertas as vacinas de terceira geração as quais conseguiram empregar informações genéticas do patógeno. Nesse tipo de vacina tem-se as proteínas que representam antígenos relevantes para a proteção do hospedeiro sem a necessidade do patógeno em si, levando o indivíduo a conseguir informações suficientes para produzir anticorpos contra tal antígeno, imunizando-o contra futuras infecções (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Foram realizados testes em animais, os quais foram inoculados com plasmídeos que carregam genes que são expressos nas células transfectadas, células nas quais o DNA plasmidial injetado teve a capacidade de penetrar as membranas citoplasmáticas e nucleares que, sob a regulação de um promotor, utilizando enzimas necessárias, irá ser transcrito em uma fita de RNA mensageiro que posteriormente será traduzido em proteínas no citoplasma e, por fim, serão capturadas pelas células apresentadoras de antígeno (APC) ou fragmentadas em peptídeos antigênicos gerando, conseqüentemente, repostas imunológicas, obtendo anticorpos de extrema importância para o organismo, dando a proteção necessária quando entrar em contato com o patógeno, que com o auxílio das células citotóxicas, irão identificar as células infectadas e destruí-las mesmo sem o contato prévio com o vírus ou bactéria, levando-o a obter também a memória imunológica, a qual é fundamental para a profilaxia (GLENTING; WESSELS, 2005).

As vacinas gênicas foram desenvolvidas tanto de forma profilática quanto de forma preventiva. A vacina profilática tem a capacidade de estimular a resposta humoral por apresentar em sua composição partículas semelhantes aos do vírus como, por exemplo, as proteínas, porém sem conter o DNA viral o qual é responsável pelas malignidades, ou seja, pelo quadro infeccioso no hospedeiro. A vacina terapêutica é adquirida a partir de proteínas consideradas antígenos virais, que quando apresentadas ao organismo humano levará a indução da resposta celular do sistema imune, ajudando as células imunocompetentes a combater a infecção do agente etiológico, quando o mesmo, entrar em contato com o sistema imunológico do organismo imunizado (ROITT; DELVES, 2013).

As vacinas gênicas, quando produzidas em larga escala, apresentam um custo relativamente mais baixo quando comparadas às vacinas clássicas, pelo fato da produção dessas vacinas compostas de frações celulares, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos terem um custo mais elevado. O controle de qualidade acaba se tornando mais eficaz, mais fácil, já que se tem uma noção da quantidade de proteína produzida, já que não precisa de uma rede de refrigeração e, por serem estáveis à temperatura ambiente, a comercialização acaba atingindo regiões de difícil acesso, facilitando então o transporte, distribuição e eficácia da ação de programas de imunização em diversas regiões (LOPES et al. 2012).

Uma das principais vantagens dessa vacina é que assim como as vacinas clássicas, ela induz a produção de anticorpos e estimula a resposta imune celular, tanto de linfócitos T CD4+ (auxiliares) quanto de linfócitos T CD8+ (citotóxicos) sem apresentarem risco de reversão da atenuação além de poderem ser produzidas contra agentes infecciosos de difícil cultivo e de baixa atenuação e, também, apresentar em sua composição, mais de um agente (FOK et al., 2015).

Algumas vacinas, de primeira e segunda geração, não são recomendadas para crianças, idosos e imunocomprometidos justamente pela alta chance de reversão da atenuação, já que o sistema imunológico se apresenta imaturo, no caso de crianças, ou deficiente, no caso de idosos e imunocomprometidos. A vacina contra tuberculose (BCG) que é contra-indicada para esse grupo de risco, por ser obtida a partir da atenuação do *Mycobacterium bovi*, bactéria atenuada da tuberculose, já que apresentam riscos de reversão, podendo ocasionar a infecção, o desenvolvimento de vacina gênica contra a tuberculose não apresentou tal risco para essa população (Kano et al. 2007).

Alguns riscos também devem ser destacados, como a integração do plasmídeo ao genoma do hospedeiro, podendo gerar mutagênese pela ativação de proto-oncogenes ou inclusive pela inativação de genes supressores tumorais. Porém nos ensaios clínicos, demonstram baixa probabilidade, a presença de reações auto-imunes, devido à indução de anticorpos ao DNA (anti-DNA) (KANO; VIDOTTO; VIDOTTO, 2007).

Técnicas moleculares para a obtenção de novos antígenos

A partir dos anos de 1970, novas tecnologias foram permitindo isolar genes específicos e purificá-los, fazendo com que o DNA ganhasse não só um novo enfoque, mas também, uma análise mais cautelosa e, com o passar do tempo, foi possível cada vez mais não só isolar novas regiões, novas sequências de nucleotídeos mas também amplificá-las, ajudando ainda mais a realizar pesquisas para diagnosticar doenças genéticas, doenças infecciosas e buscar uma forma de tratá-las ou amenizar a sintomatologia dessas doenças (CASTELO et al., 2004).

A tecnologia do DNA recombinante é um conjunto de técnicas que apresenta uma ampla aplicação, uma vez que, pode ser utilizada para estudar mecanismos de replicação e de expressão gênica, para determinar uma sequência específica de um

determinado gene para obter a proteína a qual ele codifica e, até mesmo, desenvolver culturas de bactérias para produzirem diversas substâncias com fins tanto biotecnológicos, como algumas enzimas, quanto com fins comerciais, como hormônios e vacinas (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Dentro dessa tecnologia, também existe um processo denominado de clonagem molecular, no qual é feita a retirada de um gene específico de uma molécula de DNA estudada e colocada no vetor, como um plasmídeo; esse plasmídeo vai ser colocado então num sistema biológico, onde é necessário ser uma célula pois necessita de metabolismo próprio, como uma bactéria, a qual irá incorporar o plasmídeo novo ao seu citoplasma e irá produzir, em condições ideais, a molécula inserida no plasmídeo, levando a milhares de cópias do DNA recombinante, o qual contém agora, uma quantidade amostral de interesse (TORRES et al. 2014).

A clonagem é um processo que consiste basicamente em isolar e propagar moléculas de DNA idênticas, onde é necessário inicialmente fragmentar o DNA de interesse, denominado também de inserto, o qual será inserido num vetor; em muitos casos é utilizada uma outra molécula de DNA, como os plasmídeos, formando assim uma molécula recombinante. Essa molécula é introduzida numa célula hospedeira compatível, a qual necessita de um metabolismo próprio, gerando um processo denominado de transformação, onde a nova célula transformada irá produzir milhares de cópias desse DNA recombinante (GLENTING; WESSELS, 2005).

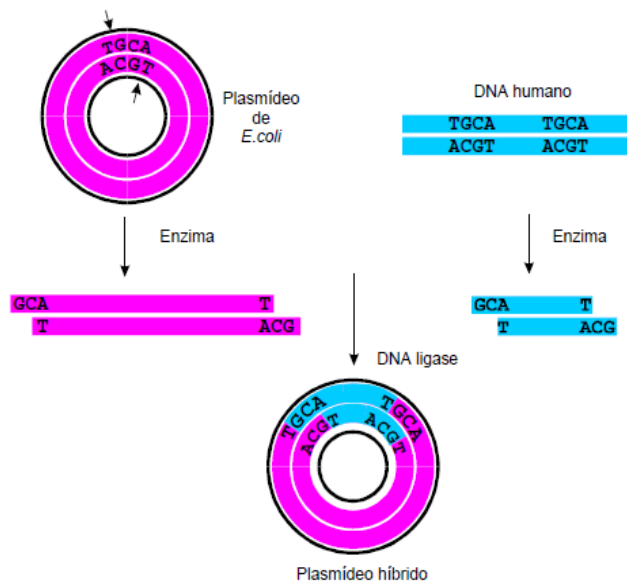
Para a retirada do gene de uma molécula de DNA é necessária a utilização de enzimas de restrição, que são endonucleases capazes que cortar a estrutura do DNA em pontos específicos, após a ação das enzimas de restrição, fragmentos de DNA são obtidos e ligados ao plasmídeo de maneira linear com a DNA ligase, já que o sítio de clivagem em cada molécula de DNA é o mesmo, dando assim, a sequência do gene de um determinado DNA ao DNA plasmidial, como por exemplo, a sequência de um gene humano para o plasmídeo de *Escherichia coli*. (LOPES et al. 2012).

Para que ocorra uma ligação covalente entre as duas cadeias é necessário um grupo -OH livre numa extremidade 3' enquanto na outra cadeia, será necessário um grupo fosfato na extremidade 5', selando assim, ambos os fragmentos; para ser expressa essa nova informação genética contida no plasmídeo é necessária a inserção (Figura 3) dessa molécula num sistema de expressão, podendo ser tanto procarioto quanto

eucarioto. Só é necessário ter metabolismo próprio, para produzir de forma amplificada as cópias do gene de interesse (GLENTING; WESSELS, 2005).

Os sistemas de expressão podem variar de simples, no qual o cultivo será de fácil manipulação ou mais complexos, que necessitam de um ambiente mais rico em nutrientes e uma temperatura mais equilibrada. A escolha desse sistema será baseada em qual gene foi inserido e onde será inserido, ou seja, em qual vetor a informação genética será colocada (LOPES et al. 2012).

Figura 3. Inserção da informação genética humano em um plasmídeo de *Escherichia coli*.



Fonte: PAVAN; MONTEIRO (2014).

Figura 4. Formação de uma molécula de DNA recombinante a partir da inserção de um inserto em um plasmídeo.



Fonte: BROWN (2003).

A utilização da PCR possibilita amplificar uma sequência de DNA sem a necessidade de clonagem molecular, pois amplifica pequena quantidade de amostra, sendo amplamente utilizada em pesquisas e no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas. Com o auxílio de iniciadores, que são oligonucleotídeos de DNA complementares às extremidades de cada fita de DNA, é possível marcar a região de interesse para ser sintetizada, promovendo assim uma alta eficiência na multiplicação de um determinado gene (ECKERSALL, 2008).

A utilização de sítios enzimáticos conhecidos, assim como, a utilização do plasmídeo para a amplificação do gene na PCR é de grande ajuda quando a amostra for utilizada na leitura no gel de agarose (Figura 4), já que precisam ser regiões de conhecimento prévio para analisar quantos pares de bases daquela amostra foram produzidos, juntamente com a noção de que as cópias geradas pela técnica serão cíclicas e após a leitura, será feito um processo de purificação para retirar todo material indesejável, no caso o restante do plasmídeo (SOUTO, 2008).

Para a leitura do resultado do PCR é necessário utilizar técnicas de eletroforese, que consiste na migração de uma partícula carregada de acordo com o campo elétrico, gerando um potencial elétrico que irá separar a amostra de acordo com a sua massa molecular (MACIEIRA, 2009).

Evolução das vacinas gênicas e sua importância para a população no quesito imunitário

O progresso da biologia molecular motivou vários pesquisadores do mundo a utilizar genes e outros métodos moleculares, como forma de terapia, podendo ser tanto no tratamento como na ação preventiva de várias doenças. Através do uso da biotecnologia, das vacinas de terceira geração, as vacinas gênicas, que apresentam em sua composição peptídeos, microrganismos recombinantes, dentre outras moléculas capazes de estimular a apresentação de antígenos, trazendo uma nova forma de administrar proteínas imunogênicas (TIWARI et al. 2009).

Existem diferentes tipos de vacinas e com o uso de novas tecnologias, principalmente quando se faz o uso de manipulação genética, originou-se inúmeros estudos e expectativas para o desenvolvimento de novas opções de vacinas, algumas dessas vacinas recombinantes ainda estão em fase de desenvolvimento, outras em fase de testes, para uma maior segurança, apesar de apresentarem resultados positivos nos testes realizados, muitos estudos ainda são necessários para uma comprovação de sua eficiência e de sua segurança, um dos motivos pelo qual muitas dessas vacinas não se encontram ainda no mercado, além de apresentarem como objetivo fundamental, uma resposta rápida, segura e eficiente.(BATISTA et al. 2007).

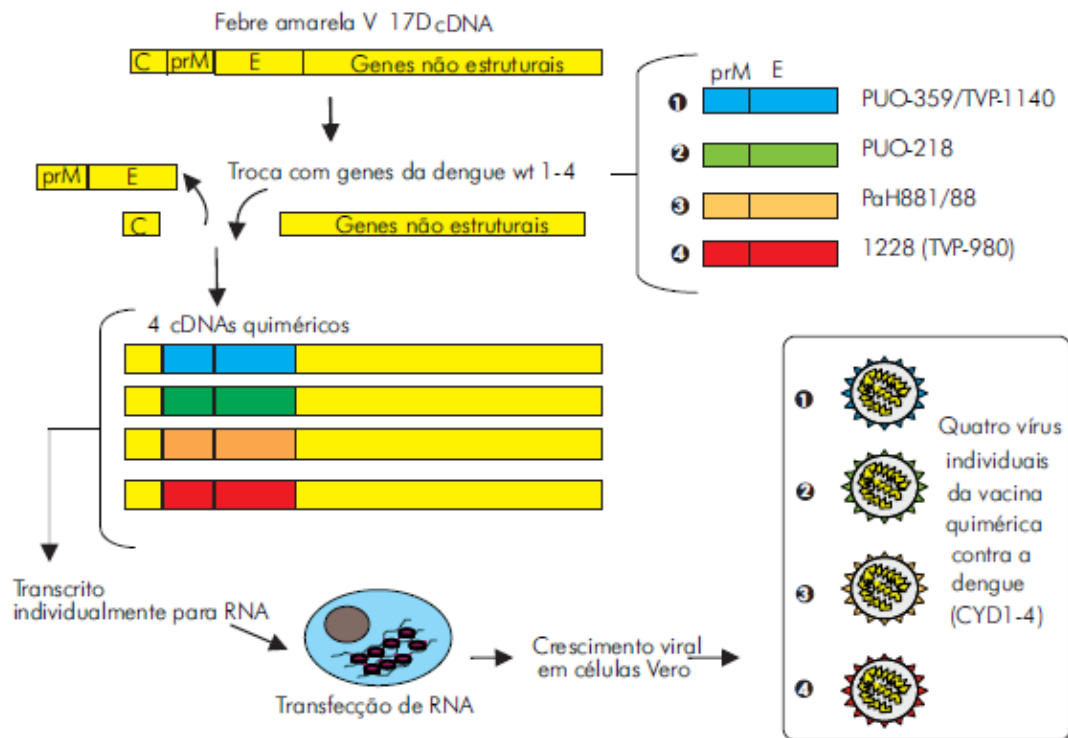
Uma vacina recentemente desenvolvida e de grande importância pública foi a vacina contra a Dengue, que com o auxílio das técnicas moleculares, possibilitou a utilização do vírus vivo e atenuado da Febre amarela, porém de maneira recombinante, apresentando em sua estrutura genes do vírus da Dengue. (SANTOS, et al. 2014).

O vírus da dengue, pertencente ao gênero *Flavivirus* apresenta quatro sorotipos que podem causar infecções nos seres humanos, podendo ser sintomática ou assintomática. Quando sintomática, apresentam quadros leves e limitados até os quadros mais avançados, como a febre hemorrágica, síndrome do choque da dengue, entre outros que podem ter uma evolução fatal, levando pesquisadores a desenvolverem diversas tecnologias, como vacinas contendo o vírus atenuado, vetores do vírus recombinante para expressar os antígenos a partir do envelope, proteínas recombinantes e as vacinas gênicas. Contudo, a vacina que obteve destaque foi a vacina tetravalente que contém o vírus recombinante e atenuada tendo como base a cepa da vacina contra a febre amarela, apresentando segurança para aplicação em humanos além de ser imunogênica; porém, ainda vem sendo avaliada em estudos para a produção em larga escala (GUY et al. 2010).

A composição da vacina tetravalente contra a dengue foi desenvolvida a partir da substituição dos genes que codificam as proteínas da pré-membrana e do envelope (Figura 6), utilizada na vacina da febre amarela pelos genes de cada um dos quatro sorotipos existentes da dengue, sendo caracterizada então, como uma vacina combinada, contendo cepas recombinantes que resultam dos quatro sorotipos da dengue (CYD1, CYD2, CYD3, CYD4 em uma única só preparação, CYD1-4, formando assim a vacina quimérica que leva à imunização contra todos os sorotipos da dengue (SANTOS, et al. 2014).

Todas as vacinas devem ser submetidas a vários testes de segurança e imunogenicidade, podendo ser, a vacina da dengue, realizada tanto *in vitro*, quanto em células primárias ou adaptadas, incluindo células humanas e *in vivo*, em modelos animais, principalmente em primatas não humanos, avaliando seu tropismo, estrutura, capacidade de multiplicação, assim como, o risco de transmissão por mosquitos vetoriais e, principalmente, verificar a imunidade protetora contra os quatro sorotipos virais circulantes (GUY et al. 2010).

Figura 6. Desenvolvimento da vacina quimérica, dos quatro sorotipos da dengue a partir da substituição dos genes que codificam a proteína da pré-membrana e do envelope da febre amarela.



Fonte: GUY et al. (2010).

As vacinas de RNA são uma variação das vacinas gênicas. Essas vacinas são feitas a partir do RNA mensageiro que codifica proteínas virais de interesse. Esse RNA é produzido e incorporado em lipossomos ou, até mesmo, em micropartículas para posteriormente ser inoculado em animais resultando no transporte do mRNA para o interior das células onde irá ocorrer a tradução e, conseqüentemente, a produção da proteína que será apresentada ao sistema imunológico resultando na estimulação da resposta humoral e celular, sendo utilizadas principalmente contra o vírus da imunodeficiência felina, vírus da leucemia felina, entre outros. Apesar de suas vantagens ainda se encontrarem restritas para a área veterinária e com os estudos crescentes dessa vacina, não se exclui o fato de que futuramente poderão ser utilizadas para os seres humanos (TORRES et al. 2014).

A utilização de lipossomos, vesículas artificialmente produzidas a partir de lipídeos, permite incorporar antígenos ou em sua superfície ou em seu interior. Caso sejam envolvidos por proteínas do envelope viral, serão mimetizados, criando uma certa conformação com o envelope natural do vírus e, por apresentar características

semelhantes a tal envelope, serão apresentadas ao sistema imunológico quando inseridas no organismo. Essa estratégia permitiu que algumas vacinas com essa composição fossem licenciadas em diversos países europeus, como é o caso da vacina contra a influenza e da hepatite humana (BATISTA et al. 2007).

A tecnologia do DNA recombinante ajudou a prevenir não só doenças bacterianas e virais mas também, contra parasitas, como é o caso da vacina contra do agente causador da esquistossomose, *Schistosoma mansoni* que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013) é uma doença parasitária que vem acometendo milhões de pessoas no mundo, superada apenas pela malária quando se trata de doenças parasitárias, considerada endêmica em 78 países e apresentando um alto índice de mortalidade, onde o controle da doença é realizado por meio da intervenção no meio ambiente pelo controle dos caramujos com moluscidas, saneamento básico, dentre outros procedimentos.

O grande desafio para desenvolver a vacina contra a esquistossomose seria a identificação de antígenos que irão promover, pelo menos, o mesmo nível de proteção que já é obtido com alguns modelos, sendo a maioria dos estudos atualmente, concentrados em vacinas de subunidades, proteínas purificadas e antígenos recombinantes, porém os antígenos apresentados só foram capazes de reduzir a carga parasitária e não levaram o organismo a imunidade contra a doença (WILSON; COULSON, 2009).

Com o avanço das técnicas de biotecnologia foi possível sequenciar o genoma desse microrganismo, onde foi detectado que grande parte das proteínas de *S. mansoni* não possuíam similaridade detectável com as já existentes no banco de dados. Porém, com a utilização da eletroforese bidimensional permitiu a separação, identificação e quantificação das proteínas observando-se que 70% dessas proteínas estavam presentes nas 4 fases do ciclo de vida do parasita, podendo então, serem utilizadas para a apresentação de antígenos e para o desenvolvimento de uma vacina profilática, sendo as proteínas de membrana melhores, segundo os ensaios clínicos, mesmo sendo questionada segundo sua estabilidade, a proteína fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* (SmPGM). Essa proteína atua como enzima que participa da glicólise, catalisando o passo 8 da glicólise e a mesma apresentou efeito protetor referente a uma resposta imune em camundongos (LUDOLF et al, 2014).

Zhou e colaboradores (2008) identificaram que a SmPGM apresenta um gene que consiste em 753 nucleotídeos, os quais codificam uma proteína de 250 aminoácidos, apresentando uma massa molecular de 28,26 kDa, e através da PCR em tempo real, foi demonstrado que o nível do mRNA desse gene é mais elevado nos esquistossômulos do que nos outros estágios de desenvolvimento do parasito, o que levou a utilização do extrato proteico de vermes adultos enriquecido com proteínas de membrana (sendo SmPGM a principal) adquiridas do tegumento do parasito, para induzir uma resposta imune protetora no hospedeiro.

Em diversos estudos perceberam que algumas dessas proteínas, como a SmPGM, conseguiu expressar-se como antígeno de maneira eficiente porém não induziram uma boa resposta imunológica, e foram descartadas para utilização vacinal sendo a proteína ligadora de ácido graxo com 14 kDa (Sm14) a utilizada como antígeno vacinal, já que apresentou uma boa indução da resposta imunológica. Além de ter apresentado bons resultados clínicos, essa proteína apresentou-se em excelente qualidade de fabricação, sendo utilizada atualmente para vacinação contra a Esquistosomose em alguns países (LUDOLF et al, 2014).

Existem duas principais vias de administração, a intramuscular e a intradérmica, sendo a intramuscular mais utilizada, na maioria das vacinas, quando se trata de imunização genética, já que o DNA plasmidial é injetado diluído em uma solução salina, sendo colocado no meio extracelular, como o vírus da influenza, vírus da dengue e o vírus da herpes. Já a intradérmica, é necessária uma técnica denominada de biobalística, onde o DNA plasmidial é colocado sobre micropartículas de ouro sendo introduzido esses microprojéteis (0,5-5 mm), por intermédio de um aparelho (gene gun), que ao ser acelerado a alta velocidade, gera uma onda de choque que ajuda a penetrar a barreira celular e a membrana plasmática sem afeta-las, deslocando a molécula de DNA para o interior das células e tecidos de plantas, e também em bactérias, protozoários, fungos e animais, inicialmente as micropartículas aceleradas alojam-se aleatoriamente nas organelas, e posteriormente o DNA é dissociado pela ação do líquido celular, penetrando assim no genoma de maneira não-letal, destacando-se em relação a intramuscular que, por cair no meio extracelular, onde fica sujeito à ação das nucleases que degradam o DNA de forma rápida (ROSINHA, 2004).

As vacinas gênicas apresentam uma série de vantagens sobre os tipos de vacina convencionais, principalmente por não utilizarem o microrganismo em sua fabricação, mas sim, o gene, peptídeos, entre outras moléculas, que irão apresentar o antígeno para o sistema imunológico, oferecendo assim, menor risco de reversão do patógeno, imunizando o indivíduo de uma maneira muito mais eficiente, podendo inclusive serem transportadas facilmente para os países, uma vez que, são estáveis em temperatura ambiente e apresentam estabilidade a altas e baixas temperaturas, o que contribui para a manutenção da qualidade e facilidade no transporte (SRIVASTAVA, LIU, 2003).

Essas vacinas apresentam também vantagens econômicas, uma vez que, sua produção em larga escala apresenta custo menores em sua produção do que o custo para a produção não só dos outros tipos de vacina mas também entre outras formas de imunização (ROSINHA, 2004).

Considerações finais

O projeto de Imunização no Brasil está em constante crescimento, o qual teve início com a Revolta da Vacina em 1904 e veio se consolidando com diversas vacinas ao longo dos anos, e o avanço da tecnologia colaborou para o desenvolvimento de técnicas que auxiliam na produção de novas vacinas, contra novas doenças que, estão em constante crescimento contaminando populações diversas, tendo em vista que até hoje a vacinação é a metodologia que apresenta melhores resultados na prevenção de doenças e que cada vez mais, estão em ascensão perante sua qualidade e eficiência.

As vacinas gênicas podem ser utilizadas para prevenir qualquer doença infecciosa seja elas bacteriana, virais e parasitárias com um baixíssimo risco de possibilidade de reversão, além de apresentarem facilidade no controle de qualidade, podendo inclusive, com o auxílio das técnicas moleculares e da bioinformática, qualificar e quantificar a abundância de carga viral, bacteriana e, até mesmo, das proteínas e antígenos presentes em cada amostra. Apresentam um diferencial gratificante por permanecerem estável em temperatura ambiente, podendo ser distribuídas facilmente para qualquer país do mundo, principalmente naqueles onde apresentam locais com alta incidência dessas doenças infecciosas, sem perder sua qualidade vacinal.

O sistema de vacinação apresenta-se evolutivamente contra determinadas doenças as quais não se tinha uma prevenção vacinal, como é o caso da Dengue e da Esquistossomose, onde a saúde pública utilizava metodologias de controle dessas doenças como principal foco, uma vez que, a vacinação até certo momento estava fora de cogitação, algo que foi revertido com a tecnologia do DNA recombinante, que ainda apresenta uma série de estudos para prevenir outras doenças as quais ainda não se tem uma ação preventiva tão eficiente quanto as vacinas, assim como para melhorar a qualidade das vacinas já existentes para diminuir as reações adversas, podendo assim, atingir agora um grupo maior de pessoas passíveis de prevenção por imunização, como é o caso de crianças, idosos e imunocomprometidos.

4. Referências Bibliográficas

BARBOSA, M. S. et al. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 235-244, jan./jun. 2012.

BISETTO, L. H.L.; CIOSEK, S. I. Análise da ocorrência de evento adverso pós-vacinação decorrente de erro de imunização. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 70, n. 1, p. 87-95, Feb. 2017.

BATISTA, C. M. et al. Lipossomos e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 43, n. 2, p. 167-179, abr./jun., 2007.

CAMPOREALE, G. et al. Desarrollo de una vacuna profilactica de segunda generacion contra el papilomavirus humano. **Medicina**, Buenos Aires, v. 71, n.3. p. 261-266, maio/jun. 2011.

CASTELO, A. A. M. C. et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 4, p. 469-476, maio 2004.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p.20, set./dez. 2010.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinal Journal**. v. 185, n. 1, p. 23-27, jun. 2010.

- FOK, E. T.; PENNY, C. B.; MHLANGA, M. M.; WEINBERG, M. S. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing increases the efficacy of homologous-dependent repair of donor sequences in mammalian cells. **South Africa Journal of Science**. Pretoria, v. 111, n. 7/8, p. 1-5, Jul./Aug. 2015.
- GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v. 4, n. 26, p. 1-5, Sep. 2005.
- GUY, B. et al. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra a dengue. **Human Vaccines**. Lugar ?, v. 6, n. 9, p. 669-705, set. 2010.
- KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 709-726, out./dez. 2007.
- LOPES, D. S. A. et al. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 234-245, jul. 2012.
- 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, set./dez. 2010.
- LUDOLF, F. Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico. Tese doutorado – Centro de Pesquisa René Ranchou, Programa de pós graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte. Maio 2012.
- MACIEIRA, D. B. et al. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 1-6, dez. 2009.
- NAOUM, P. C. **Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA**. São Paulo: Editora Santos. 2012, 301p.
- OLIVEIRA, E. et al. Eletroforese: Conceitos e Aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 1130, 2015.
- PAVAN, MG.; MONTEIRO, FA. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, c., org. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, p. 241-260.
- ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 12ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. 552 p.

- ROTHER, E. T. Revisão Sistemática X Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. v-vi, abr./jun. 2007.
- SANTOS, J. J. S. et al. A two-plasmid strategy for engineering a dengue virus type 3 infectious clone from primary Brazilian isolate. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 1749-1759, Dec. 2014.
- SOUTO, B. M. **Expressão e Purificação de Proteínas de Glândulas Produtoras de Seda das Aranhas *Nephilengys cruentata* e *Âvicularia juruensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2008. (SOUTO, 2008).
- SRIVASTAVA, I.K.; LIU, M.A. Gene Vaccines. **Annals of internal medicine**. United States of America, v. 138, n. 7, p.550-560, abr. 2003.
- TIWARI, S. et al. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 449-467, apr. 2009.
- TORRES, A. F. S. et al. Diseño de vacunas recombinantes en las enfermedades de Gumboro, Newcastle y Laringotraqueítis Infecciosa Aviar. **Ces Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medellín, v. 9, n. 2, p. 262-280, dec. 2014.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 423-431, set. 2009.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosoma mansonii Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for Therapeutic Vaccin? Plos neglected tropical diseases, v. 2, p. e290, set. 2008.
- ZARDO, G. P. et al. Vaccines as an agent for immunization against HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, Curitiba, v.19, n.9, p. 3799-3808, set. 2014.
- ZHOU, Y. et al. Cloning, expressing and characterizing of a phosphoglycerate mutase gene of Schistosoma japonicum. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, China, v. 24, n. 9, p. 1550-1555, set. 2008.