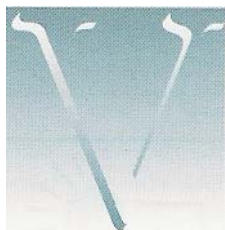


# Vacinas de DNA

## O paradigma das vacinas gênicas



vacinas podem ser apresentadas em diferentes formas. O estado de imunidade pode ser induzido através do uso de variados tipos de vacinas, as quais encontram-se comercialmente disponíveis e são baseadas em microrganismos vivos atenuados, microrganismos vivos inativados, extratos de microrganismos ou proteínas recombinantes. Além das formas já disponíveis, encontram-se em estágio experimental as vacinas à base de peptídios, as que utilizam microrganismos vivos recombinantes e as vacinas de DNA. A vacina de DNA é a mais recente forma de apresentação que veio revolucionar o campo da vacinologia. Ela representa um novo caminho para a administração de antígenos. O processo envolve a introdução direta do DNA plasmideano, que possui o gene codificador da proteína antigênica, e será expressa no interior das células. Este tipo de vacinação apresenta uma grande vantagem, pois fornece para o organismo hospedeiro a informação genética necessária para que ele fabrique o antígeno com todas as suas características importantes para geração de uma resposta imune. Isto sem os efeitos colaterais que podem ser gerados quando são introduzidos patógenos, ou os problemas proporcionados pela produção das vacinas de subunidades em microrganismos. As vacinas de DNA, em teoria, representam uma metodologia que se aproxima da infecção natural, alcançando a indução da proteção desejada.

### VANTAGENS E PROBLEMAS POTENCIAIS DAS VACINAS DE DNA

O uso das vacinas de DNA oferece uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando compara-

do com as vacinas clássicas, especialmente se considerarmos a sua utilização nas condições oferecidas pelos países em desenvolvimento. Por exemplo, a produção em larga escala é bem mais barata, a manutenção do controle de qualidade é mais fácil, e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente. Estes fatores facilitam o transporte e a distribuição, e viabilizam a transferência desta tecnologia para estes países. Além disso, técnicas de biologia molecular possibilitam a modificação de seqüências e a adição de epitopos heterólogos a uma proteína antigênica, usando-se somente manipulações simples feitas diretamente no plasmídeo, que é o componente das vacinas gênicas. Essas manipulações genéticas podem nos dar subsídios para entendermos as relações entre estrutura e função destes antígenos com a resposta imune. Como possíveis desvantagens podem ser citadas a possibilidade de integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro de maneira danosa ou a exposição do sistema imune a níveis constitutivos de antígenos durante o período de expressão do gene. No primeiro caso, o DNA plasmideano pode gerar patogenias, especialmente se este se integrar em células somáticas, gerando mutagênese por inserção, que pode levar a ativação de protooncogenes ou inativar genes supressores de tumor. No segundo caso, a apresentação constitutiva de um antígeno pode ter conseqüências desastrosas, como indução de tolerância e auto-imunidade. Nenhuma evidência destes fenômenos foi comprovada, e testes rigorosos devem ser feitos para que se possa passar dos modelos experimentais para o homem.

### VETORES DE EXPRESSÃO PARA A

#### Vasco Azevedo

Prof. adjunto do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Obteve o seu grau de doutor pelo Institut National Paris-Grignon e pelo Institut National de La Recherche Agronomique de Jouy-en-Josas na França e fez seu pós-doutorado na Universidade da Pensilvânia. [vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br)

#### Sergio Costa Oliveira

Prof. adjunto do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Obteve o seu grau de doutor pela Universidade de Wisconsin-Madison (USA), onde também fez o seu pós-doutorado. [scozeue@icb.ufmg.br](mailto:scozeue@icb.ufmg.br)

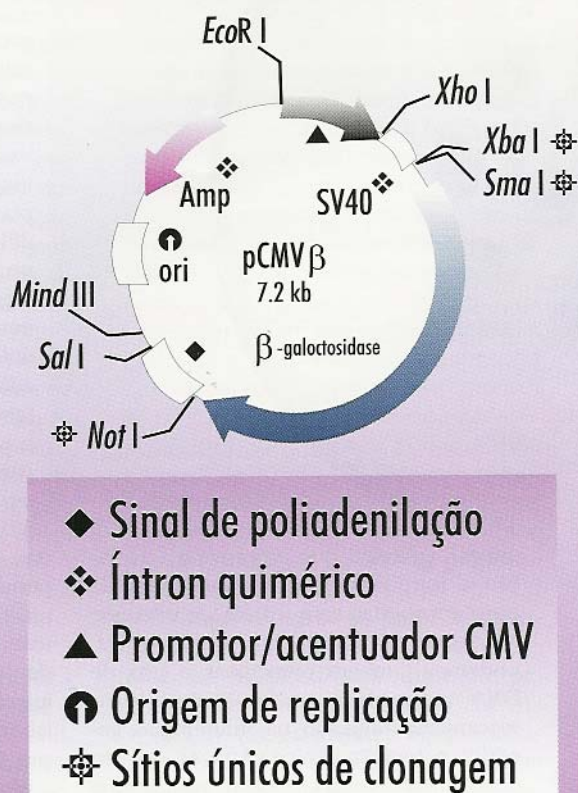
## CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE DNA

Nas últimas duas décadas foram desenvolvidos diferentes tipos de vetores de expressão. A expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos tornou-se uma técnica essencial para ajudar a elucidar os mecanismos dos processos celulares e da transferência gênica. Os vetores usados rotineiramente para a transferência gênica são os retrovírus, vírus vaccinia ou adenovírus, que necessitam de uma etapa de empacotamento do DNA. O sistema de vacinas de DNA contrasta com os sistemas de expressão acima citados, pois não necessita desses vetores complexos. O princípio das vacinas de DNA se baseia na clonagem do gene desejado em plasmídeos, o qual deverá ser expresso dentro das células do hospedeiro sem posteriores manipulações. Os plasmídeos, fragmentos de DNA extracromossômico circulares presentes nas bactérias, foram inicialmente isolados espontaneamente da natureza. A partir destes, alguns pesquisadores começaram a construir plasmídeos quiméricos reunindo os elementos importantes de cada um. Hoje chegamos à terceira geração de plasmídeos, com alta performance e maior complexidade, dos quais derivam a atual família de vetores de expressão em células de mamíferos.

### ELEMENTOS QUE INFLUENCIAM NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Os vetores de expressão usados em vacinas de DNA em geral possuem uma região promotora e acentuadora forte, um íntron quimérico otimizado e um sinal de poliadenilação (figura 1). Esses três elementos combinados são essenciais para uma expressão alta e constitutiva nas células de mamíferos. Possuem também um elemento adicional, como os sítios únicos de clonagem especialmente desenhados para não comprometer a expressão das seqüências clonadas. Ressaltamos outro elemento adicional que não tem ligação com a expressão, mas é de extrema importância para a produção de vacinas de DNA: é a origem de replicação do plasmídeo ColE1 da *Escherichia coli*.

Fig. 1



- ◆ Sinal de poliadenilação
- ◇ Íntron quimérico
- ▲ Promotor/acentuador CMV
- ⊙ Origem de replicação
- ⊕ Sítios únicos de clonagem

**Figura 1.** Plasmídeo pCMV-bgal.

Elementos que influenciam na expressão gênica

Discutiremos abaixo a importância de todos estes elementos: Região acentuadora e promotora

Esta é a região que controla a expressão do gene clonado. Geralmente é obtida do citomegalovírus humano (CMV), contudo, outros promotores podem ser usados. A característica intrínseca importante é a capacidade de conduzir uma expressão forte em vários tipos de células. A sua natureza promíscua foi comprovada quando um plasmídeo contendo o gene codificador para a cloranfenicol acetiltransferase (CAT) regulado pelo CMV (acentuador/promotor) foi transfectado em células de camundongos. A atividade desta enzima foi encontrada em 24 de 28 tecidos analisados. Íntron quimérico

Logo em seguida à região acentuadora/promotora, os vetores possuem um íntron quimérico. A composição deste íntron é feita com o sítio doador do primeiro íntron do gene da betaglobulina humana e o sítio receptor da região variável da cadeia pesada do gene da imunoglobulina. Sua localização na região 5' anterior (no caso do inserto ter sido clonado a partir de cDNA) impede a utilização de sítios

doadores crípticos. Estes, se presentes, podem ser utilizados na excisão da molécula supracitada, o que resulta em uma diminuição ou na ausência de expressão. Experimentos de transfecção com os genes repórteres CAT e luciferase demonstraram que a presença deste íntron flanqueando os insertos de cDNA aumenta o nível de expressão, variando de acordo com o tipo de cDNA. No caso do CAT houve um aumento de 20 vezes na expressão gênica, e no caso da luciferase, um incremento de apenas três vezes.

### Sinal de poliadenilação

O sinal de poliadenilação possui a função de adicionar a cauda poli (A) e de ser reconhecido no término da transcrição pela RNA polimerase II. A poliadenilação aumenta a estabilidade e tradução da molécula de RNA. Como pode ser observado na figura 1, ele é colocado imediatamente após a enzima Not I dos sítios únicos de clonagem.

Elementos adicionais

Na literatura, foi demonstrado in vitro e in vivo que grandes estruturas de "grampo" na extremidade 5' não-traduzida do RNA mensageiro reduzem o nível de tradução em eucariotos superiores. Os sítios únicos de clonagem dos vetores de expressão são desenhados através de predições para que não se adicionem estas estruturas aos RNAs transcritos. A origem de replicação de procariotos que é geralmente utilizada em plasmídeos de expressão é a ColE1. A manutenção do alto número de cópias está diretamente ligada a eventos que ocorrem no início da replicação e são controlados pela origem ColE1. Ele é o mais bem caracterizado sistema de número de cópias, sendo capaz de manter mais de 20 plasmídeos por célula de *Escherichia coli*, o que resulta em uma alta produção de DNA plasmídeo em bactéria.

### PRINCIPAIS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

As vacinas gênicas podem ser administradas através da injeção direta de DNA diluído em solução salina no músculo do animal; ou através do processo da biobalística, utilizando-se o gene gun (arma de genes), aparelho que promove a aceleração e introdução de



Foto: Wendell Sérgio F. Meira

**Figura 2.** Avaliação histoquímica da expressão do gene que codifica a b-galactosidase em orelhas de camundongos BALB/c que foram vacinados pelo processo da biobalística, utilizando-se o plasmídeo pCMV-bgal. A b-galactosidase hidrolisa o substrato X-Gal, gerando uma coloração azulada que é detectada nas células e tecidos transfetados.

micropartículas de ouro encobertas com o DNA de interesse na derme do animal. Em menor escala, podemos também mencionar o uso de DNA encapsulado em lipossomos como mecanismo utilizado na imunização

genética e terapia gênica. Através do uso destas metodologias, pode-se induzir uma resposta imune longa e mesmo com apenas uma dose da vacina gênica, ativando linfócitos T citotóxicos e linfócitos B para a produção de anticorpos.

#### Injeção direta de DNA no músculo

A possibilidade da transferência de genes sem a utilização de um vetor viral estimulou o desenvolvimento de uma nova técnica de imunização que é

uma simplificação radical na metodologia de vacinação. Para obter-se uma resposta imune desejável basta introduzir o DNA plasmídeo contendo o gene que codifica uma proteína antigênica, a qual será expressa dentro de células do organismo hospedeiro. O sistema de imunização gênica mais comumente utilizado baseia-se na injeção intramuscular (i.m.), geralmente nos músculos femoral ou quadríceps de camundongos, utilizando-se uma seringa usada para insulina com agulha de diâmetro em torno de 27. Inocula-se em torno de 50 microlitros (ml) do plasmídeo em uma concentração de 1mg/ml em cada perna do animal a ser imunizado. Níveis satisfatórios da expressão de genes repórteres já foram detectados mesmo depois de um ano e meio após uma única injeção de DNA no músculo. Em nosso laboratório, utilizamos uma administração de cardiotoxina a 10mM cinco dias antes da injeção com o DNA de interesse, para induzir um ciclo de necrose e reparo muscular com o objetivo de aumentar os níveis de expressão gênica. A biobalística

O processo da biobalística é uma metodologia simples e efetiva para a introdução e expressão de genes em diferentes organismos, incluindo células e tecidos animais. Em 1992, o grupo do Dr. Stephen Johnston, da Universidade do Texas (Southwestern Medical Center, TX), foi o primeiro a utilizar esta tecnologia para induzir uma resposta imune contra a luciferase através do bombardeamento de DNA na derme de camundongos BALB/c. A biobalística utiliza microprojéteis em alta velocidade para introduzir ácidos nucleicos em células e tecidos in vivo. Foram desenvolvidos e construídos diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas (0,2 a 4mm de diâmetro) encobertas com ácidos nucleicos a velocidades superiores a 1.500km/h-1. Foi demonstrado que estas partículas penetram a parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Conseqüentemente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo ou não a integração do gene exógeno no genoma do organismo em questão. O aparelho (gene gun) que utilizamos foi projetado e construído pelo nosso colaborador, Dr. Elibio L. Rech, do Centro Nacional de Pesquisas em Recursos Genéticos e Biotecnologia da EMBRAPA, e a onda de choque necessária para deslocar a molécula de DNA é gerada através do

### A terceira revolução em vacinas: vacinas de DNA

Foi realizado entre os dias 26 de outubro e 7 de novembro, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o primeiro curso e workshop sobre vacinas de DNA da América Latina. Este evento pioneiro foi coordenado pelos professores Sergio Costa Oliveira, Vasco Azevedo, Alfredo Miranda de Goes e Elibio Rech, e contou com o patrocínio do Centro Brasil Argentina de Biotecnologia, (CBAB), GIBCO-BRL, Pharmacia, Perkin Elmer. Todos os envolvidos neste evento têm grande interesse em monitorar o progresso do desenvolvimento deste tipo de vacinas e, se possível, ajudar os grupos que estão trabalhando na área, repassando esta nova tecnologia, além de identificar o momento ideal para um congresso brasileiro sobre vacinas de DNA. Vários especialistas de diferentes nacionalidades se reuniram neste evento com o objetivo de discutir o modo de ação das vacinas de DNA, as vias e esquemas de administração, indução dos diferentes tipos de resposta imune, proteção, limitações e riscos potenciais. As apresentações serão convertidas em forma de artigos que serão apresentados em breve para a comunidade científica. Todas as informações sobre este evento podem ser obtidas na home page: [http://www.icb.ufmg.br/~azevedov/Vacinas\\_DNA.html](http://www.icb.ufmg.br/~azevedov/Vacinas_DNA.html)

#### International Meeting on Vaccines

De 29 de novembro a 3 de dezembro deste ano será realizado em Salvador - Bahia o Congresso Temático da Sociedade Brasileira de Imunologia. O tema do evento é vacinas. Estão programadas mesas redondas e conferências versando sobre aspectos básicos e aplicados da imunologia, contando com a presença de diversas autoridades mundiais no assunto. Maiores informações na home page: <http://www.icb.ufmg.br/~scozeus/VACCINES>

gás hélio a baixa pressão. Em nosso laboratório, temos utilizado o gene repórter que codifica para a b-galactosidase para otimizar o processo de imunização genética através da biobalística. A figura 2 mostra a expressão do gene da b-galactosidase em orelhas de camundongos BALB/c após a imunização com o plasmídeo pCMV-bgal precipitado em micropartículas de ouro de 1,5 a 3nm de diâmetro. Uma das grandes vantagens deste método é a utilização de pequenas quantidades de DNA (<1mg), mais do que cem vezes menos material biológico quando comparado com a injeção direta no músculo (em torno de 100mg).

### A RESPOSTA IMUNE

Diversos pesquisadores induziram a ativação da resposta imune humoral e celular em animais experimentais, utilizando os processos da biobalística e a injeção direta no músculo. Contudo, muitos parâmetros precisam ser mais bem estudados para o entendimento dos diferentes tipos de resposta imune produzidos. Dentre estes parâmetros podemos citar a quantidade de DNA inoculado, as vias e métodos de administração e as células apresentadoras de antígeno envolvidas no processo.

Em nosso laboratório, temos estudado as diferentes formas de administração das vacinas gênicas com o objetivo de otimizar os parâmetros técni-

cos, maximizando a expressão gênica e conseqüentemente a resposta imune. A figura 3 mostra os níveis de IgG total produzidos contra a b-galactosidase em animais imunizados pela injeção intramuscular do plasmídeo pCMV-bgal, pelo processo da biobalística e através da inoculação de DNA encapsulado em lipossomos. Como se pode observar, os níveis de anticorpos totais mais altos foram obtidos quando a biobalística foi a metodologia utilizada em comparação com os demais sistemas. A injeção direta no músculo induziu níveis de anticorpos um pouco abaixo do nível produzido pelos animais imunizados através da biobalística, sendo que o tratamento usando lipossomos foi o menos eficiente na indução da produção de anticorpos específicos.

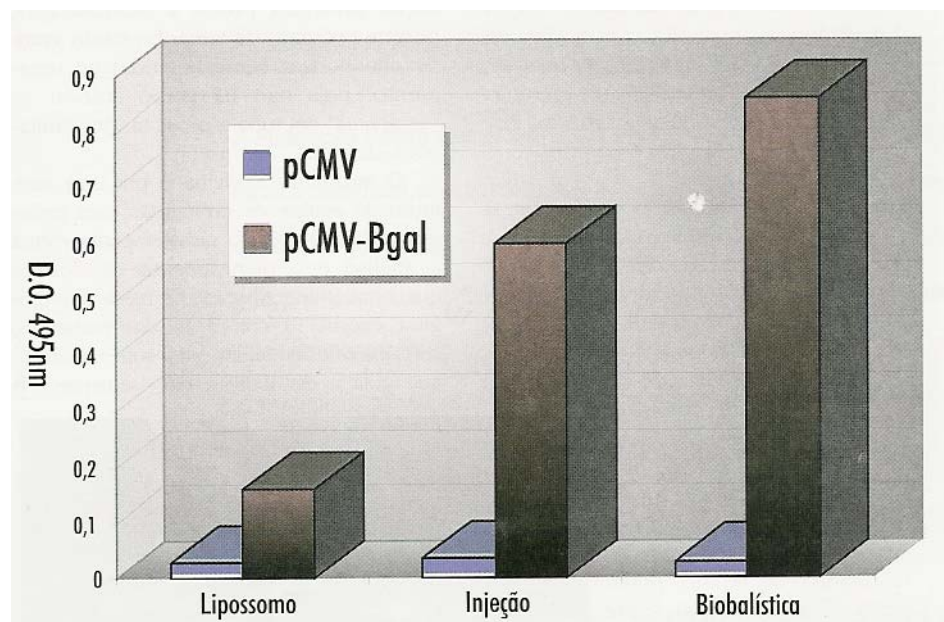
No que refere-se ao perfil de citocinas produzido, tem sido sugerido que o processo da biobalística induz um padrão de resposta imune do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), enquanto a injeção intramuscular induz um perfil de resposta imune do tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Contudo, esta dicotomia simplista não é exclusiva, pois alguns pesquisadores têm demonstrado que a biobalística não induz apenas respostas do tipo Th2. Nossos resultados preliminares têm demonstrado que a injeção intramuscular produz mais IgG2a, o que caracteriza um perfil do tipo Th1, enquanto a biobalística induz a produção de IgG1 e IgG2a, o que

caracteriza um perfil misto do tipo Th0. Isto sugere que a polarização de um tipo de resposta imune do padrão Th1 induzido pela injeção intramuscular pode ser devida ao efeito adjuvante de grandes quantidades de DNA plasmídeo injetado no animal.

Nossa experiência revela que a utilização da biobalística como metodologia de imunização produz resultados menos díspares, provavelmente devido ao uso de um aparelho, o que diminui a variação no processo em relação ao uso da injeção com a seringa. A injeção intramuscular resulta em contrastes mais acentuados na resposta imune obtida, que pode ser explicada também pelo fato de que o DNA é injetado extracelularmente, onde a maioria das moléculas de ácidos nucléicos são degradadas rapidamente por nucleases. Em contraste, no processo da biobalística o DNA é inserido no interior da célula, evitando uma redução inicial no número de plasmídeos. No que se refere ao custo, a biobalística torna-se um procedimento mais caro devido à aquisição do gene gun comparado com agulha e seringa utilizadas na injeção intramuscular.

Como pode-se notar, as duas metodologias possuem vantagens e desvantagens, sendo a combinação entre ambas a melhor opção para a otimização do processo de imunização genética. A indução de um padrão de resposta imune do tipo Th1 pela injeção i.m. pode ser utilizada no combate direto a infecções intracelulares como a leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, brucelose, listeriose, e alergias; enquanto o perfil Th2, supostamente gerado pela biobalística, pode ser direcionado para o controle da esquistossomose e outras doenças tropicais cada vez mais crescentes nos países em desenvolvimento.

Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas gênicas resultam em uma apresentação antigênica via moléculas de MHC de classe I e classe II, o que mimetiza o processo resultante de uma infecção natural, ativando linfócitos T CD4+, CD8+ e a produção de anticorpos. Os diferentes tipos de resposta imune induzida pela imunização genética justificam a sua aplicação nos campos das doenças infecciosas, alergias e tumores, e, independente da metodologia empregada, entendemos que a vacina gênica é hoje a tecnologia mais moderna para ser utilizada no controle das enfermidades do nosso mundo.



**Figura 3.** 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.