

Biotecnologia aplicada às vacinas de DNA: Técnica e Avanços

Biotechnology applied to DNA vaccines: Advances and Technical

Franklin Barbalho Magalhães¹(Phd. em Imunologia) Wagner José Tenório dos Santos¹ (Bacharel em Biomedicina) Camilla Larisse Silva¹ (Graduação em biomedicina)

1: ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR (ASCES)

email: fbmagalhaes@hotmail.com; wagnerjtenorio@hotmail.com;
camillalarisse@hotmail.com.

Numero de palavras: 1,850

Numero de tabelas:1

Resumo

A vacinação com a molécula de DNA é uma das mais promissoras técnicas de imunização contra uma variedade de patógenos e tumores, para os quais os métodos convencionais não tem sido eficientes. A vacina de DNA baseia-se no uso de sequências do material genético do agente infeccioso que codificam antígenos imunodominantes. As vacinas de DNA oferecem uma série de vantagens quando comparadas às vacinas clássicas, em termos econômicos e técnicos. O objetivo deste estudo foi mostrar as aplicações da vacina de DNA e suas técnicas e avanços. Trata-se de um estudo de revisão bibliográfica de natureza exploratória e descritiva, realizado através levantamentos de artigos e revisões em língua inglesa e portuguesa. Dentre as normas deste contexto, os artigos foram lidos, selecionados criteriosamente e agrupados em quatro categorias: trabalhos que relatam os tipos de vacinas utilizadas, trabalhos que relatam o desenvolvimento de novas vacinas de DNA, trabalhos que relatam os avanços no Brasil e trabalhos que comparam e descrevem as vantagens e desvantagens em relação às outras vacinas. Apesar dos resultados promissores, a vacinação com DNA ainda só é utilizada em experimentações.

Palavras chaves: Biotecnologia, Proteínas Recombinantes, Vacinas de DNA,

Abstarct

Vaccination with the DNA molecule is one of the most promising techniques for immunization against a variety of pathogens and tumors, for which conventional methods have not been effective. The DNA vaccine is based on the use of genetic sequences encoding the infectious agent immunodominant antigens. DNA vaccines offer a number of advantages when compared to classical vaccines, in economic and technical. The aim of this study was to show the applications of DNA vaccine and its techniques and advances. This is a bibliographic review of exploratory and descriptive nature, conducted through surveys and review articles in English and Portuguese. Among the standards in this context, the articles were read, carefully selected and grouped into four categories: papers that include the types of vaccines used, studies reporting the development of new DNA vaccines, studies reporting the progress in Brazil and studies that compare and describe the advantages and disadvantages compared to other vaccines. Despite promising results in DNA vaccination is still only used in experiments.

Keywords: Biotechnology, Recombinant Proteins, DNA vaccines.

INTRODUÇÃO

A palavra “Biotecnologia” representa um conjunto de técnicas que utiliza sistema biológico e organismos vivos para produção ou modificação de produtos e processos para uso específico (AZEVEDO, 2008).

Atualmente essa área se tornou um importante aliado para a saúde pública através da criação de vacinas para diversas doenças sendo a melhor alternativa para combater doenças endêmicas e surtos epidêmicos, (OMS, 2006). Os avanços da Imunologia e da Biologia Molecular permitiu o desenvolvimento de vacinas de DNA que ao contrario das vacinas anteriores, foram projetas para gerar resposta imune celular e humoral. Esse tipo de tratamento teoricamente permite curar além das doenças infecciosas, curar outras doenças como: câncer, alergias e doenças autoimunes (SRIVASTAVA, LIU, 2003).

A vacina de DNA baseia-se no uso de sequências do material genético do agente infeccioso que codificam antígenos imunodominantes. Estas sequências são inseridas em vetores (plasmídeos ou vetores virais). A estrutura da vacina de DNA inclui a clonagem genes ou fragmentos de genes relacionados à virulência ou patogenicidade de um microrganismo em um plasmídeo, também chamado de vetor (GURUNATHAN *et al*, 2000).

Essas vacinas recombinantes quando comparadas às vacinas clássicas oferecem uma série de vantagens, em relação aos termos econômicos e técnicos. Levando em conta o custo de produção das vacinas gênicas em larga escala é menor em relação ao custo de produção das vacinas compostas de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (WHALEN, 1996, ROBINSON, 1997). É mais fácil manter o controle de qualidade dessas vacinas a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração própria, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem ser liofilizadas (WAINE; McMANUS, 1995).

Tais fatores facilitam o transporte como também a distribuição de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento (AZEVEDO *et al.*, 1999, GLENTING; WESSLES, 2005).

Contudo, alguns aspectos devem ser levados em consideração como os riscos de integralização de DNA em células humanas, inserção em genoma viral entre outros problemas.

Diante do exposto é interessante e necessidade que se faça uma revisão sobre a aplicação as vacinas de DNA, mostrando suas técnicas e avanços para a ciência em correlação avaliar e divulgar estas novas descobertas.

METODOLOGIA

Tipo de estudo:

Trata-se de um estudo de revisão bibliográfica de natureza exploratória e descritiva, realizado através levantamentos de artigos e revisões em língua inglesa e portuguesa.

Objeto do estudo:

Artigos publicados em revistas e jornais disponíveis nos sites: pubmed e Scielo. Foram utilizados os seguintes indicadores:

- Em português: vacinas de DNA, biotecnologia e saúde pública.
- Em inglês: DNA vaccines and biotechnology.

Período do estudo:

A coleta de dados foi realizada no período de Fevereiro de 2012 a Outubro de 2012.

Critérios de inclusão:

- Artigos publicados em revistas científicas nos últimos cinco anos, disponíveis nos sites pudmed e scielo.
- Artigos que abordam o tema vacinas de DNA;
- Artigos que abordam composição das vacinas;
- Artigos que abordam as técnicas de produção das vacinas de DNA;
- Artigos que comparem a eficiência da entre entre a vacina comercial e a de DNA.

Critérios de exclusão:

- Artigos anteriores a cinco anos de publicação;
- Artigos sem formatação científica;
- Artigo com acesso pago;

Resultados

Foram pesquisados 363 artigos com o nome de biotecnologia e 490 com o nome de vacinas de DNA, desse total foram selecionados 17 artigos mais focados ao nosso tema.

Os tipos de vacinas:

Segundo este levantamento, 94% dos autores selecionados (15 autores) classificam as vacinas existentes em três grupos: vacinas atenuadas, vacinas inativadas e vacinas recombinantes.

Vacinas atenuadas:

Também definida como vacina de microrganismos vivos. Segundo 75% dos autores (12 autores) esse tipo de vacina serve para criar o imunizante (Vírus ou bactéria) da doença que se quer prevenir. Os 25% restante afirmam que essa vacina além de promover o imunizante, ela é tratada com substâncias químicas que diminuem a capacidade de atacar o nosso organismo.

Vacinas inativadas:

Ao contrario das atenuadas ela é composta por microrganismos mortos. Tendo em vista essa definição 60% dos autores acreditam que essa vacina é composta de bactérias ou vírus inativados por meio de substâncias químicas ou de mudanças bruscas de temperatura. Outros autores completam que isso só funciona para os germes que são reconhecidos pelo corpo humano mesmo quando já estão mortos.

Vacinas recombinantes:

Essa recombinação se da a partir do DNA (Plasmídeos). 90% dos autores colocaram em seus estudos que essa é a formula mais moderna de uma vacina.

Técnicas das vacinas de DNA:

Segundo 80% dos autores, essa técnica consiste em isolar um pedaço do material genético do micróbio, justamente aquele que é responsável pela produção da proteína capaz de despertar o sistema imune. Em seguida os pesquisadores

injetam esse gene em um hospedeiro (fungo, bactéria, células eucarióticas) que passará a sintetizar a mesma proteína com a qual será feita a vacina.

Dentre esses 45% acreditam que os plasmídios utilizados como vacinas devem conter os seguintes elementos essenciais: um promotor de expressão para células de mamíferos; sinal de poliadenilação (poliA) do transcrito (mRNA), um marcador de seleção; uma origem de replicação procariótica e sítio de múltipla clonagem onde é inserido o gene de interesse. Outras sequências também são importantes como intron que aumenta a atividade do promotor, peptídeo sinal e sequências de 6nucleotídeos com função imunoestimulatória.

Etapas da clonagem in vivo

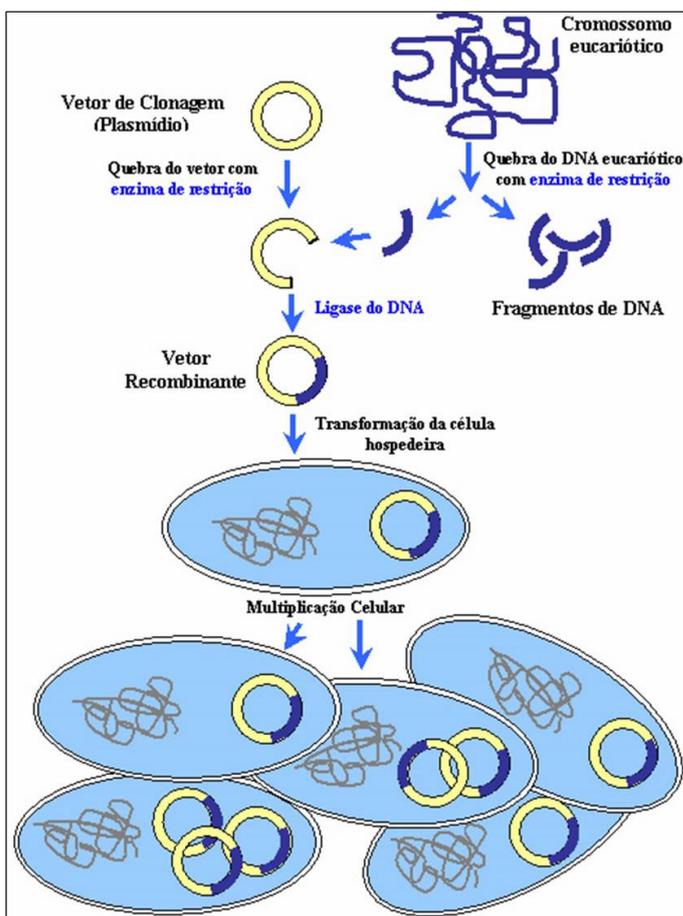


Imagem: Em suma, os passos essenciais para efetuar a clonagem são:

- Isolamento do DNA genômico
- Desenho dos primers
- Amplificação por PCR
- digestão enzimática do DNA do vetor e do fragmento
- ligação do fragmento ao vetor
- introdução do DNA recombinante nas células hospedeiras
- seleção e identificação dos clones recombinantes
- Inoculação intramuscular

Os avanços:

Resultados promissores, e surpreendentes, também têm sido obtidos com aplicação de moléculas de DNA através inalação com administração intranasal, tendo como alvo doenças respiratórias. (Menck e Ventura; 2007)

Vários vírus mortais, como hepatite B, hepatite C, rotavírus e HIV, também têm sido alvos para terapia com DNA, também com resultados promissores. (Menck e Ventura; 2007)

Atualmente um vacina de DNA contra as infecções pelo vírus da dengue está sendo desenvolvida pelo Navy Medical Research Center, em ensaios clínicos de fase 1, utilizando genes que codificam as proteínas estruturais prM e E do sorotipo DENV-1 (revisto por WHITEHEAD et al., 2007). No Brasil, o grupo liderado pela Dra. Ada Alves (IOC, FIOCRUZ-RJ) tem apresentado estudos importantes sobre uma vacina de DNA baseada na proteína NS1 (COSTA, FREIRE e ALVES, 2006).

Vantagens e desvantagens:

Quando comparadas às vacinas tradicionais, as vacinas de DNA apresentam mais vantagens econômicas, técnicas e logísticas, pois possuem um controle de qualidade mais simples, não necessitam de refrigeração para seu transporte, já que elas são estáveis em temperatura ambiente; possuem baixo custo de produção e manutenção, entre outros. Outra vantagem dessas vacinas é que elas estimulam a produção de linfócitos T, responsáveis por identificar e matar as células infectadas.

As principais desvantagens das vacinas de DNA são: dificuldade em reconhecer, selecionar e correlacionar todas as partes do DNA do agente que se quer combater; possibilidade da indução de uma doença autoimune; integração do DNA no cromossomo do hospedeiro, causando mutações que poderiam levar ao aparecimento de um câncer; e indução de tolerância do hospedeiro às substâncias estimuladas pelo DNA.

Mais recentemente, foram iniciados protocolos clínicos em fase I (de segurança no uso em humanos), e alguns já foram concluídos, sem que se verificasse nenhum efeito tóxico. É possível que em mais alguns poucos anos seja

lançado o primeiro produto farmacológico formado apenas por pequenas duplexes de DNA, que atue silenciando a expressão de um gene. De fato, vários são os problemas de saúde que resultam de expressão aumentada de um ou mais genes, entre eles, tumores, hipercolesterolemia e infecções virais.

Além disso, são consideradas como drogas pequenas e assim poderão ser usadas em pouco tempo como produtos farmacêuticos comuns, podem ser introduzidas diretamente ou através de lipossomos, sem as questões de biossegurança normalmente levantadas para vetores virais.

Segundos os autores, as vacinas foram classificadas em três tipos e foram apresentadas vantagens e desvantagens sintetizadas na tabela 1.

TABELA 1: Mostra a relações das vantagens e desvantagens dos tipos de vacinas citados pelos autores

Tipos de vacinas	Vantagens	Desvantagens
Vacinas atenuadas	Maior eficácia	Indução de reações inflamatórias locais e sistêmicas, e perigo de causar doenças.
Vacinas inativadas	Menos tendência de induzir reação	Requer doses de reforço para manutenção da imunidade.
Vacinas recombinantes	Produção de linfócitos T auxiliares (CD4) e (CD8), Citocinas na produção de anticorpos.	Imunização limitada: age apenas com os componentes proteicos do patógeno.

As vacinas têm como principal função estimular o nosso sistema imunológico a produzir uma resposta humoral e celular capaz de combater o agente infeccioso direcionando a resposta para vários componentes do agressor ou a um componente específico e dessa forma manter o nosso corpo livre da doença.

Vacinas recombinantes (DNA) são capazes de induzir resposta imune humoral e celular. Apesar do grande potencial de induzir imunidade protetora, a vacina de DNA nem sempre apresenta bons resultados. (KANO et al, 2007)

Fatores como o tipo de vetor (promotor) e da localização do plasmídeo, dose e tipo do antígeno, presença ou ausência de sequências imunoestimuladoras, presença de plasmídeo adicional ou na forma de vacinas de DNA multivalentes, influenciam no desenvolvimento do tipo de resposta imune, estes fatores podem ser otimizados para melhorar esta resposta imune. (KANO et al, 2007)

O Brasil é um país que pesquisadores norte-americanos estão de olho para a implantação de várias técnicas de vacinas de DNA para combater a raiva em cães e gatos, pois proporcionam toda a tecnologia e aparatos para realizar a mesma.

Algumas das vacinas recombinantes que o Brasil produz são:

- Vacina gênica contra herpes
- Vacina gênica contra diarreia
- Vacina gênica contra tuberculose

(<http://www.ebah.com.br/content/ABAAE-W4AK/vacinas-dna>)

CONCLUSÃO

As vacinas de DNA têm dado uma contribuição real no campo da sorologia e possuem uma grande vantagem em relação às vacinas tradicionais, o que torna essa tecnologia um instrumento importante no combate às doenças infecciosas que afetam a nossa sociedade.

Comparado com outros tipos de tecnologia para produção de vacinas, as vacinas de DNA têm um grande potencial de aplicação. Sendo diferente portanto, de vacinas atenuadas, inativadas ou de proteínas recombinantes onde cada uma requer um processo de produção e purificação original. Em adição, o plasmídeo de DNA é relativamente mais estável que as outras vacinas existentes, significando que as vacinas de DNA podem ser mais apropriadas para vacinação em massa. Assim, as vacinas de DNA podem ser consideradas uma nova plataforma para vacinas futuras, uma vez que podem gerar resposta imune celular e humoral.

Os avanços recentes estão sem dúvida fazendo renascer as perspectivas que eram esperadas anteriormente, mas os sucessos devem ser observados com otimismo cauteloso, e ainda requerem intenso trabalho de pesquisa. Temos convicção de que o empenho da comunidade acadêmica, que estamos testemunhando, trará mais aplicações bem-sucedidas da terapia gênica e que esta deve se firmar como importante ferramenta na prática clínica de um futuro relativamente próximo.

Esperamos que o Brasil possa atuar como participante ativo nessas pesquisas, pois tem condições de realizar contribuições significativas, e ampliar seu impacto na medicina experimental.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, VAC. Biotecnologia na produção de vacinas e kits de diagnóstico. Ciênc. vet. tróp., Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.126-129, abril, 2008.
- DINIZ, MO; FERREIRA, LCS. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. estudos avançados 24 (70), 2010.
- DAVIS, H. L., MCCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. Microbes Infection, Berlin, v.1, n.1, p.7-21, 1999.
- DONNELLY J. J.; ULMER J. B. DNA vaccines for viral diseases. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 32, p. 315-222, 1999.
- GLENTING, J., WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. Microbial Cell Factories, Barcelona, v.4, n.26, p.1-5, 2005.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, applications, and optimization. Annual Review of Immunology, California, v.18, p.927-974, 2000.
- HENKE, A. DNA immunization – a new chance in vaccine research? Medical microbiology and immunology, Berlin, v.191, p.187-190, 2002.
- KANO, FS; VIDOTTO, O; VIDOTTO, MC. 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.
- LATOUCHE, J. B.; SADELAIN, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. Nature Biotechnology, New York, v.18, n.4, p.405-40, 2000.
- Menck, C. F. M, Ventura, Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica; Rev. USP n.75 São Paulo nov. 2007
- REYES-SANDOVAL A.; ERTL H. C. J. DNA vaccines. Current molecular medicine, v. 1, p. 217-243, 2001.
- ROBINSON, H. L. Nucleic acid vaccines: an overview. Vaccine, Kidlington, v.15, n.8, p.785-787, 1997.
- SIEGRIST, C. A. Potencial advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. Vaccine, Kidlington, v.15, n.8, p.798-800, 1997.

SRIVASTAVA I. K.; LIU M. A. Gene Vaccines. *Annal of Internal Medicine*, v. 138, n. 138, p. 550-559, apr. 2003.

VAN TIENHOVEN, E. A. E.; TEN BRINK, C. T. B.; VAN BERGEN, J.; KONING, F.; VAN EDEN, W.; BROEREN, C. P. M. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine*, Kidlington, v.19, p.1515-1519, 2001.

WAINE, G. J., McMANUS, D. P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, Califórnia, v.11, n.3, p.113-116, 1995.

World Health Organization (Organização Mundial de Saude) :
<http://www.who.int/en/>; 2006

WHALEN, R. G. DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.2, n.3, p.168-175, 1996.