

CAROLINA BELLINI PARISE

**ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS DE
IMUNIZAÇÃO GÊNICA: ELETROPORAÇÃO
AUMENTA CONSISTENTEMENTE A RESPOSTA
IMUNE HUMORAL**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Parise, Carolina Bellini

Estudo comparativo de protocolos de imunização gênica: eletroporação aumenta consistentemente a resposta imune humoral/ Carolina Bellini Parise.-- São Paulo, 2008.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: Comparative study of protocols of gene immunization: electroporation consistently improves the humoral immune response.

1. Imunização gênica 2. Eletroporação 3. Vacina gênica 4. Vacina

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

Orientador

Prof. Dr. Sang Won Han

Co-orientadora

Prof^a. Dr^a. Jane Zveiter de Moraes

Aos meus pais José Rubens e Regina
pela educação, amor e amizade
incondicionais e essenciais para a
minha formação e minha vida.

Ao meu irmão Murilo, simplesmente por
ser meu irmão e representar este papel
como ninguém jamais poderia.

Obrigada!!!

Aos meus avós maternos Olival (*in memorian*) e Jacyra e aos paternos Romeu (*in memorian*) e Annita que foram o alicerce para tudo: meus pais que são maravilhosos e que me ensinaram a ser o que sou hoje.

Obrigada!!!

Aos meus tios maternos Carlos e Nilza
pela força e confiança imensuráveis em
todos esses anos.

Aos meus tios paternos Elaine (in
memorian), Eliana e Marcelo pela
amizade e por fazerem parte da minha
educação.

Obrigada!!!

Às minhas primas “irmãs e confidentes”

Branca e Lívia, que eu adoro demais e sei que sempre estarão ao meu lado.

Aos meus primos Fabrício, Felipe, Leonardo, Lucas, Saulo, Tércio, Vinicius pela convivência e amizade.

Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

À minha Profa. Dra. Jane Zveiter de Moraes pela amizade, confiança, companheirismo, paciência, dedicação e conhecimento indiscutível sobre ciência.

Aos meus amigos pós-graduandos que de alguma forma se tornaram amigos para toda a vida: Aline, Eliete, Jamille, Juliana, Regiane e Renan.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sang Won Han pelos ensinamentos e dicas enriquecedoras e infalíveis e colegas do Cintergen que me ajudaram neste trabalho: Bianca, Chester, Daniela, Eduardo e Vanessa.

Aos professores e pós-graduandos do Departamento de Biofísica que colaboraram com o enriquecimento da minha formação.

Aos técnicos Cléber, Ivan, Mauro e o adorado Tio Nelson pela amizade e incansável ajuda nos experimentos.

À secretária Ilza e ao funcionário Fernandes pelo auxílio burocrático e pela amizade.

Ao meu fiel companheiro Rogério (Taroba) por agüentar meus dias de mau humor e também por fazer parte dos meus melhores momentos. Te adoro.

Aos meus amigos de “Taquá” que sempre estarão lá me esperando de braços abertos com os conselhos que enriquecem sempre minha vida: Adriana Micali, Ana Moi, Andreza Amaral, Daniel Gilio, Daniela (Carnera), Fernanda Moi (Barbie), Fernanda Grigolli (Boca), Fernanda Straccini (Bokinha) e colegas que fizeram parte em algum momento da minha vida.

Aos meus amigos de São Paulo que exorcizam a solidão desta cidade nos fins de semana.

*"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso,
cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a
cortina se feche e a peça termine sem aplausos."*

(Charles Chaplin)

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BbKi	Inibidor de serina protease extraído de <i>Bauhinia bauhinioides</i>
BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guérin</i>
BSA	Soro albumina bovina
BGH	Hormônio de crescimento bovino
CD 147	<i>Cluster of differentiation</i> 147 (molécula de superfície celular)
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CMV	Citomegalovírus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEMc	DMEM completo – meio DMEM suplementado com 2mM de glutamina, 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ep	Eletroporação
G418	Geneticina
HBS	Tampão hepes salina
HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
hCMV	Citomegalovírus humano

hFGF-2	<i>human Fibroblast Growth Factor - 2</i>
hVEGF165	<i>human Vascular Endothelial Growth Factor 165</i>
Id	Idiotipo
i.d.	Intradérmica
i.h.	Intrahepática
IL-12	Interleucina-12
i.m.	Intramuscular
i.m. + ep	Intramuscular mais eletroporação
i.p.	Intraperitoneal
i.s.	Intraesplênica
i.v.	Intravascular
LB	<i>Luria-Bertani medium</i>
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
OPD	<i>o</i> -fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salina
PBS/BSA	Tampão fosfato salina contendo albumina sérica bovina
pcDNA3	Vetor plasmideal pcDNA3
PoliA	Poliadenilação
pVAX	Vetor plasmideal pVAX
r.i.	Resposta imune
RNA	Ácido ribonucléico

s.c.	Subcutâneo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
s.i.	Sistema imune
SOC	Meio LB enriquecido com 20 mM glicose
TE	Tris-HCl com EDTA
uP	Vetor plasmideal uP

ÍNDICE

I. Introdução	01
II. Objetivos	17
III. Materiais e Métodos	18
1. Materiais	18
1.1. Animais	18
1.2. Vetores	18
1.3. Imunógenos	19
1.4. Anticorpos e antígenos	19
1.5. Bactéria	20
1.6. Linhagem celular A293T	20
1.7. Reagentes	20
1.8. Meios de cultura e suplementos	21
1.9. Soluções e tampões	22
1.10. Materiais descartáveis	23
1.11. Equipamentos	23
2. Métodos	24
2.1. Transformação bacteriana	24
2.2. Preparação de DNA plasmideal em larga escala e purificação por ultracentrifugação em gradiente de césio	25
2.3. Transfecção com fosfato de cálcio	27
2.4. Imunizações	27
2.5. Protocolos de imunização	31

2.6. Coleta de sangue	32
2.7. Titulação dos soros de animais imunizados e quantificação de proteínas em sobrenadante de cultura de células transfectadas	32
2.8. Análises estatísticas	34
IV. Resultados	35
1. Comparação entre as vias de imunização i.d. e i.m.	35
2. Comparação da r.i. humoral após imunizações com gene carregado por diferentes vetores plasmideais	36
3. Avaliação da produção de hVEGF pelas células A293T transfectadas com pcDNA3/ hVEGF165	37
4. Avaliação da r.i. humoral de animais imunizados via i.s.	38
5. Avaliação da r.i. humoral aos protocolos II, III e IV	39
6. Avaliação da r.i. obtida ao final dos esquemas de imunização propostos nos protocolos II, III e IV	41
7. Avaliação da r.i. humoral a um reforço adicional	43
8. Comparação entre as imunizações gênica e protéica	45
V. Discussão	47
VI. Conclusões	58
VII. Resumo	59
VIII. Abstract	61
IX. Referências bibliográficas	63
X. Anexo	77

FIGURAS E TABELA

Tabela 1: Protocolos de imunização	32
Figura 1: Imunização i.s. com DNA plasmideal	28
Figura 2: Imunização i.m. com DNA plasmideal	29
Figura 3: Imunização i.m. seguida de ep com DNA plasmideal	30
Figura 4: Imunização i.p. com 5×10^6 células	30
Figura 5: Comparação de r.i. após imunizações vias i.d. e i.m.	35
Figura 6: Comparação de r.i. a diferentes vetores	36
Figura 7: Cinética de produção de hVEGF165 pelas células modificadas com pcDNA3-hVEGF165	37
Figura 8: Análise de r.i. após imunização via i.s.	38
Figura 9: Influência dos reforços nos diferentes protocolos de imunização	40
Figura 10: R.i. ao final dos protocolos de imunização	42
Figura 11: Efeito de um reforço adicional na r.i.	44
Figura 12: Comparação entre as imunizações gênica e protéica	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Esquema circular do plasmídeo pcDNA3 de expressão em eucarioto	77
Anexo 2: Esquema circular do plasmídeo pVAX de expressão em eucarioto	78
Anexo 3: Esquema circular do plasmídeo uP de expressão em eucarioto	79
Anexo 4: Artigo submetido, artigo publicado e participação em congresso	80

I. Introdução

Vacinação ou imunização ativa é a introdução de um antígeno estranho em um organismo com o objetivo de estimular o sistema imune (s.i.) a desenvolver uma resposta capaz de eliminar esse antígeno. Esses termos foram postulados há cerca de 200 anos (1796) quando *Edward Jenner* mostrou que a inoculação de material de lesão de pele de gado, causada por *cowpox* (*L.vaccinus*), protegeu contra uma doença altamente contagiosa e freqüentemente fatal, a varíola (*smallpox*) (Theves, 1997). Essa preparação da lesão de pele continha supostamente patógenos mortos, atenuados e seus produtos e, ao ser introduzida em pessoas saudáveis, estimulou a produção de células de defesa ou anticorpos protetores sem causar a doença. Desde então, a idéia da vacinação contra doenças infecciosas apresenta uma extensa história de sucessos (Abbas e Lichtman, 2003; Henke, 2002; Koide e cols., 2000).

Sabe-se hoje que uma vacina ideal deve apresentar flexibilidade diante de um número de epitopos distintos de um determinado patógeno para ampliar a capacidade de proteger o hospedeiro a uma nova variação ou mutação do agente causador da doença (Donnelly e cols., 1997). Os avanços na biotecnologia e um maior conhecimento de componentes indutores e efetivos da resposta imune (r.i.) ajudaram no desenvolvimento e implemento de novas formas de vacinas (Levine e Sztein, 2004).

As vacinas podem ser classificadas em duas categorias: vacinas compostas por organismos inteiros e vacinas constituídas de subunidades (Schunk e Macallum, 2005). As vacinas de organismos completos incluem bactérias ou vírus

mortos ou inativados, como a vacina da cólera ou da gripe (influenza), ou organismos completos atenuados, resultantes de sucessivas passagens por células ou organismos hospedeiros, como as vacinas de Bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG) para a tuberculose (Koide e cols., 2000) e a *Sabin* para a poliomielite (Norrby e Prusiner, 2007; Koide e cols., 2000).

Já as vacinas de subunidades ou antígenos purificados incluem aquelas constituídas de proteínas purificadas (Koide e cols., 2000), proteínas recombinantes (Kupek e cols., 2007), peptídeos sintéticos (Wu e cols., 2007), anticorpos anti-idiotípicos (Mohanty e cols., 2007), polissacarídeos bacterianos (Abbas e Lichtman, 2003), toxóides (Koide e cols., 2000) e também as de última geração compostas por genes codificadores de antígenos para os quais se deseja obter r.i. (Abbas e Lichtman, 2003). A tecnologia do DNA recombinante possibilitou o desenvolvimento dessa nova geração de vacinas também conhecida como vacinação gênica (Donnelly e cols., 2003).

O conhecimento sobre o tipo de r.i. que é eficaz para neutralizar o antígeno é uma importante etapa para a concepção da vacina apropriada. O processo imunológico pelo qual se desenvolve a proteção conferida pelas vacinas compreende o conjunto de mecanismos através dos quais um organismo reconhece uma substância como estranha para, em seguida, metabolizá-la, neutralizá-la e/ou eliminá-la. A defesa atribuída pela r.i. adaptativa aumenta com exposições repetidas ao antígeno, promovendo as imunidades humoral e celular.

A imunidade humoral é mediada por anticorpos que reconhecem e podem se ligar a moléculas de diferentes naturezas químicas, enquanto a imunidade celular é mediada por células T, que reconhecem apenas moléculas de natureza

protéica. Assim, os antígenos de natureza não protéica são ditos T-independentes e os de natureza protéica, T-dependentes. Os antígenos T-dependentes são reconhecidos pelas células do s.i. após serem processados e apresentados no contexto das moléculas do MHC. Os antígenos endógenos, derivados de proteínas citosólicas, são apresentados no contexto de moléculas MHC classe I e os exógenos, derivados de proteínas extracelulares, no contexto de moléculas MHC classe II (Abbas e Lichtman, 2003). Além dos mecanismos do s.i., a r.i. depende também de fatores inerentes às vacinas como, por exemplo, idade, doença ou tratamento imunossupressor em curso.

Os antígenos exógenos que incluem patógenos inativados e antígenos purificados estimulam r.i. suficiente para proteger o hospedeiro, principalmente após sucessivas imunizações ou administração combinada com adjuvantes. Apresentam uma característica importante que é a não reversão à forma patogênica e, por isso, podem ser usadas em indivíduos imunossuprimidos e imunodeficientes (Hanlon e Argyle, 2001).

Os antígenos purificados promovem forte r.i. e estimulam o s.i. a neutralizar, por exemplo, toxinas bacterianas que podem ser modificadas para se tornar inócuas, sem perda da imunogenicidade (Abbas e Lichtman, 2003). Antígenos polissacarídeos purificados são incapazes de induzir a formação de células de memória, mas podem se tornar eficazes quando conjugados a proteínas carreadoras (Abbas e Lichtman, 2003).

A reatividade da r.i. com a forma nativa do antígeno muitas vezes constitui dificuldade, o que representa uma desvantagem. Vale comentar que a obtenção de anticorpos capazes de reagir com a forma nativa de proteínas de membrana é

um problema freqüente quando se utilizam protocolos convencionais de imunização. Entre os principais entraves, estão a obtenção do antígeno purificado, em condições ideais e quantidades suficientes, e a necessidade de administração das vacinas combinadas com adjuvantes, que apresentam custo elevado e risco de provocar reações adversas (Donnelly e cols., 1997). A utilização de proteínas recombinantes ou antígenos sintéticos é considerada uma forma de contornar parte do problema. Ou seja, o antígeno pode ser obtido em quantidade necessária quando não existem problemas de solubilidade e há disponibilidade de reagentes que permitam sua purificação (Donnelly e cols., 1997).

Os antígenos sintéticos são baseados em epitopos antigênicos do patógeno, contêm uma seqüência de 3 a 10 aminoácidos e necessitam da conjugação a carreadores para aumentar sua imunogenicidade (Abbas e Lichtman, 2003). Entretanto, permanece muitas vezes a necessidade de administração de substâncias adjuvantes. Uma preocupação freqüente é a perda da conformação nativa observada em proteínas recombinantes e antígenos inativados, o que também compromete a reatividade da r.i. humoral com o antígeno expresso em sua correta conformação (Donnelly e cols., 1997).

Como alternativa, muitas vacinas incluem patógenos vivos atenuados - bactérias intracelulares e vírus (Hanlon e Argyle, 2001) -, cujos antígenos são processados como endógenos e, assim, peptídeos de 9 a 11 aminoácidos de comprimento ligados a moléculas MHC de classe I são reconhecidos por células T (Donnelly e cols., 1997). As vacinas de bactérias ou vírus atenuados estimulam r.i. a todos os epitopos antigênicos que o microrganismo patogênico desencadearia, promovendo uma imunidade rápida e duradoura (Abbas e Lichtman, 2003).

Porém, apesar dessa vantagem, a atenuação do patógeno pode ser incompleta e passível de mutação, o que pode comprometer a imunogenicidade ou promover reversão para a forma patogênica, constituindo risco principalmente para os indivíduos imunocomprometidos (Donnelly e cols., 1997).

Uma outra forma de estimular r.i. que veio revolucionar o campo da vacinologia é a utilização de gene ou DNA como imunógeno. Essa abordagem tem sido considerada de última geração em termos de segurança, facilidade e proteção. O gene introduzido funciona como antígeno endógeno. Em teoria, esse tipo de vacina representa uma metodologia que se aproxima da infecção natural, induzindo a proteção desejada (Hanlon e Argyle, 2001). De acordo com Henke (2002), a imunização gênica pode gerar uma r.i. humoral com anticorpos protetores que perduram por longo período, o que é uma condição necessária para a eficiência da vacinação. Além disso, tem a capacidade de induzir forte imunidade mediada por células (Belaková e cols., 2007).

A vacina gênica é apresentada na forma de vetores recombinantes, que podem ser plasmideais - *naked DNA* -, virais vivos (Donnelly e cols., 2003; Montgomery e cols., 1997) ou até mesmo protozoários (Breton e cols., 2007). Os vetores virais e plasmideais são os mais usuais e carregam genes codificadores de antígenos, eliminando a necessidade de purificação do antígeno, em geral, de difícil obtenção. Para prevenir doenças infecciosas, os vetores carregam um ou mais genes clonados de patógenos bacterianos, virais, fúngicos ou de parasitas (Montgomery e cols., 1997). No caso de doenças não infecciosas como câncer, alergia ou doença auto-imune, os vetores carregam genes codificadores de

proteínas específicas de mamífero que são de relevância no tratamento dessas doenças (Donnelly e cols., 2003; Montgomery e cols., 1997).

Em adição, a imunização gênica proporciona uma r.i. suficiente para propiciar a obtenção de anticorpos com alta especificidade e avidéz, que podem funcionar como reagentes úteis tanto no diagnóstico, como no tratamento de patologias (Tearina Chu e cols., 2001). Muitos autores descreveram a obtenção de anticorpos monoclonais após imunização genética (Leinonen e cols., 2004; Nagata e cols., 2003; Puttikhunt e cols., 2003; Timmusk e cols., 2003; Price e cols., 2001; Costagliola e cols., 1998).

O vetor viral é o sistema gênico de entrega mais utilizado atualmente, pois é uma forma fácil e efetiva de introduzir genes de interesse em células eucarióticas, e é usado tanto em pesquisas laboratoriais, como em propostas clínicas (Tomanin e Scarpa, 2004). Os principais vírus utilizados em pesquisas são os retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados e poxvírus (Tomanin e Scarpa, 2004). Os retrovírus e os lentivírus são vírus de RNA que integram seu material genético juntamente com o gene de interesse ao genoma da célula hospedeira. Essa propriedade de integração oferece riscos importantes, pois pode ocasionar uma mutagênese insercional, seja ativando um oncogene ou interrompendo um gene supressor de tumor ou regulatório da expressão gênica (Montgomery e cols., 1997). Diferentemente, os adenovírus são vírus de DNA, não integram, transportam genes de grandes dimensões e podem provocar inflamação. Por serem imunogênicos, os adenovírus têm a vantagem de atrair células do s.i. ao local de infecção, favorecendo o reconhecimento do antígeno expresso pela célula modificada (Tomanin e Scarpa, 2004; Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Seth,

2000). Porém, a imunidade pré-existente devida a infecções prévias com o vírus ou administrações repetidas pode eliminar os vírus antes mesmo da entrega do gene de interesse, comprometendo a vacinação (Srivastava e Liu, 2003). Já os adeno-associados são vírus de DNA que não são patogênicos para humanos. Entretanto, transportam genes pequenos e o processo de purificação em larga escala ainda é um problema (McCarty e cols., 2004; Tomanin e Scarpa, 2004; Linden e Berns, 2000). Por fim, a família poxvírus inclui os vírus da *vaccinia*, *canarypox* e *fowlpox*, que são vírus de DNA e podem carregar genes imensos, não integram, são altamente imunogênicos e, por isso, são muito utilizados na experimentação de vacinas, principalmente na imunoterapia do câncer (Tomanin e Scarpa, 2004).

Atualmente, em razão das limitações de cada espécie viral, vetores virais quiméricos com características favoráveis de dois ou mais vírus em um só vetor têm sido construídos e testados quanto a sua capacidade de aumentar o poder de infectar o hospedeiro, aumentar a imunogenicidade, reduzir a toxicidade e o potencial inflamatório (Tomanin e Scarpa, 2004).

Como alternativa ao vetor viral, a vacina plasmideal representa uma excelente estratégia para expressar antígenos *in vivo* e tem a vantagem de não ser um microrganismo (Hurpin e cols., 1998). A vacina de DNA plasmideal utiliza a maquinaria da célula hospedeira para transcrever o gene e processar o antígeno endogenamente, o qual será apresentado ao s.i. com a estrutura nativa apropriada para antigenicidade, mimetizando aspectos de organismos vivos atenuados para a vacinação (Donnelly e cols., 1997).

Os plasmídeos de expressão gênica são moléculas de DNA de fita dupla circulares fechadas e naturais de bactérias (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). Porém, são unidades genéticas independentes do material genético bacteriano e podem estar em centenas de cópias no citoplasma de uma bactéria (Sambrook e cols., 1989). Em geral, sítios múltiplos de clonagem são inseridos na bactéria para facilitar a clonagem e podem ser clivados por enzimas de restrição específicas para a inserção de fragmentos do DNA de interesse. As construções plasmídeais levam ainda um gene de resistência a um antibiótico para permitir a seleção dos clones bacterianos que as carregam e multiplicam (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). Por possuírem um sistema autônomo de replicação chamado origem de replicação (ORI), os plasmídeos replicam-se por todo o tempo de crescimento das bactérias em cultura. Entretanto, os plasmídeos dependem de enzimas e proteínas presentes na célula hospedeira para sua replicação e transcrição (Stover e cols., 1991; Sambrook e cols., 1989). Como os plasmídeos não replicam em mamíferos, a quantidade de plasmídeo disponível para expressão é baixa e sempre menor do que a que foi administrada, sem contar a parte que se perde na manipulação. Uma das formas para contornar esse problema é a inclusão de um promotor forte na construção do plasmídeo que aumenta a expressão do antígeno gênico em mamífero (Doria-Rose e Haigwood, 2003).

O promotor geralmente é ligado à região que carrega a seqüência gênica codificadora do antígeno que é completada por um sinal de poliadenilação (poliA) - importante para a correta terminação do mRNA (Henke, 2002).

Assim, para a imunização gênica, o DNA plasmídeo contendo o gene de interesse é purificado e utilizado como imunógeno (Wolff e cols., 1990). Uma vez

inoculado no hospedeiro, o plasmídeo transfeta as células ao redor do sítio de injeção, onde ocorre a expressão da proteína sob o controle do promotor do vetor plasmideal (Tang e cols., 1992). O antígeno expresso nas células transfectadas *in vivo* é reconhecido pelo s.i..

Como a baixa expressão gênica dos vetores plasmideais em relação aos vetores virais é muitas vezes um fator limitante (Peng e cols., 2005; Molnar e cols., 2004), diversas formas de melhoramento de vetores plasmideais para o aumento da expressão gênica têm sido descritos na literatura (Doria-Rose e Haigwood, 2003; Reyes-Sandoval e Ertl, 2001; Donnelly e cols., 1997). Promotores, *enhancers* e *introns* virais são geralmente mais fortes e podem afetar o nível de expressão do antígeno (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001) e têm sido utilizados na construção de vetores plasmideais. Estudos com vacinas de DNA plasmideal, contendo o promotor do citomegalovírus humano (hCMV) mostram aumento do nível de expressão de proteína na maioria dos tecidos de mamíferos (Doria-Rose e Haigwood, 2003). Uma outra opção descrita para aumentar expressão é a combinação do terminador de transcrição ou sinal de poliadenilação (poliA) do hormônio de crescimento bovino (BGH) com o promotor CMV (Garmory e cols., 2003; Montgomery e cols., 1997).

Existem algumas vantagens da vacinação gênica plasmideal sobre a vacinação com patógenos vivos atenuados, patógenos inativados ou até mesmo antígenos purificados. Dentre as vantagens podemos mencionar que o DNA plasmideal pode ser produzido em grande escala, é manipulado com facilidade e rapidez, apresenta baixo custo e é estável à temperatura ambiente. Além disso, o vetor plasmideal não é patogênico, quando vazio promove pouca ou nenhuma

reação imune, e possibilita a imunização contra diferentes patógenos através de uma única administração com uma mistura de vacinas (Donnelly e cols., 2003; Sasaki e cols., 2003; Henke, 2002). Para aumentar o poder da vacina é possível modificar o material genético através de manipulação de seqüências antigênicas para incluir epitopos imunogênicos adicionais, seqüências alvo celulares e motivos imunoestimulatórios (Timmerman e cols., 2002). O vetor plasmideal não requer o cultivo de agentes infecciosos perigosos para a sua produção e não apresenta riscos para crianças, idosos ou indivíduos imunocomprometidos (Donnelly e cols., 2003; Sasaki e cols., 2003; Henke, 2002).

Em relação aos vetores virais, o DNA plasmideal também apresenta vantagens, pois pode promover uma r.i. prolongada sem que para isso haja necessidade de integração cromossomal, seja em células em constante divisão – como as epiteliais - ou não – como os miócitos (Wolff e cols., 1992). Na verdade, o risco de integração cromossomal do DNA plasmideal é quase nulo graças a sua forma circular e por não ser capaz de replicar em células de mamíferos. Os vetores plasmideais são mais seguros, fáceis de serem produzidos e conservados por não serem microrganismos vivos (Montgomery e cols., 1997).

Para a transfecção e expressão eficiente do DNA em uma célula, é necessário entregá-lo por uma rota que o direcione até a população celular alvo. Diferentes vias de imunização induzem graus diferentes de resposta e o sucesso na entrega plasmideal tem sido mostrado por várias vias que incluem a intravascular (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), entrega a mucosas e, mais recentemente, têm sido também exploradas as vias intrahepática (i.h.) e intraesplênica (i.s.). Estudos feitos em animais pelos grupos

de Kasinrerker (2002) e Moonsom (2001) mostraram que a injeção direta de DNA no baço é o método mais eficiente para a indução da produção de anticorpos. Isso se deve à transfecção direta de esplenócitos e células apresentadoras de antígeno (APCs), concentrando a expressão do antígeno no baço, que inicia prontamente a r.i.. A limitação no uso dessa via de imunização é o procedimento cirúrgico que requer prática e habilidade de um veterinário ou profissional treinado para executá-lo (Moonsom e cols., 2001). Diferentes grupos de pesquisadores descreveram a obtenção de anticorpos monoclonais após uma única imunização i.s. com DNA plasmideal (Yu e cols., 2005; Velikovskiy e cols., 2000). Para avaliar a indução da r.i. humoral após uma única imunização com DNA plasmideal, camundongos receberam via i.m., i.p., i.v. ou i.s. uma mesma preparação de DNA plasmideal que codificava para a proteína CD147. Os autores observaram que apenas a injeção i.s. induziu a produção de anticorpos, que puderam ser detectados nos soros desses camundongos até seis meses após a injeção (Kasinrerker e cols., 2002).

Apesar dos resultados promissores obtidos com a entrega feita pela via i.s., a maioria dos estudos utiliza as vias i.m. e i.d. que resultam na transfecção direta de miócitos e queratinócitos, respectivamente, além de APCs (Shedlock e Weiner, 2000). A imunização pelas vias i.m. ou i.d. é realizada através de procedimento simples e efetivo como a injeção do plasmídeo ressuspendido em salina, ou de plasmídeo associado a um metal para aplicação em método biobalístico (Cohen e cols., 1998). A pele é o tecido alvo preferido para a vacinação gênica, pois é de fácil acesso e apresenta reduzido risco de efeito colateral associado à persistência do vetor plasmideal, uma vez que suas células são constantemente renovadas e,

ainda, apresentam uma maior quantidade de APCs. (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). A entrega feita pelo método biobalístico requer menor quantidade de DNA e é mais eficiente na transfecção *in situ*, mas demanda o uso de aparato dispendioso (Hanlon e Argyle, 2001).

A via i.m. é uma das rotas mais simples para a entrega gênica. A maioria dos sistemas de entrega i.m. induz resposta de células B e T comparáveis em magnitude àquelas observadas com a administração i.d. (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). Wolff e colaboradores (1990) foram os primeiros a demonstrar que plasmídeos, ressuspendidos em salina, injetados via i.m. podiam ser capturados e expressos em células musculares esqueléticas murinas sem ajuda de adjuvantes.

Vários estudos têm mostrado resultados encorajadores obtidos com o uso de vacina plasmideal em modelos animais. Merecem destaque os protocolos de imunização que utilizam vetores plasmideais para carregar genes codificadores de antígenos relacionados a tumores (Xue e Stauss, 2007; Donnelly e cols., 1995). Song e colaboradores (2000) demonstraram aumento da imunidade anti-tumor em camundongos através da injeção de DNA plasmideal que expressava o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o gene da Interleucina-12 (IL-12). Ainda, uma construção levando o idiótipo (Id) de um linfoma de célula B murino induziu r.i. humoral anti-Id específica e protegeu camundongos contra subsequente desafio com o tumor (Syrengeles e cols., 1996).

Vacinas de DNA proporcionam boa prevenção e melhora no tratamento de malignidades em modelos animais, e alguns resultados em ensaios clínicos indicam que, apesar das vacinas serem seguras e bem toleradas em humanos, é necessário aumentar sua potência (Lowe e cols., 2007; Cappelletti e cols., 2003).

Algumas estratégias podem intensificar e direcionar a r.i. à vacina de DNA, neutralizar moléculas supressoras secretadas por células tumorais e interferir nos mecanismos de evasão do tumor (Lowe e cols., 2007; Huygen, 2005; Jäger e Knuth, 2005). Plasmídeo e adenovírus recombinante, ambos carregando o cassete de expressão para o antígeno de membrana específico da próstata, foram utilizados na imunização de pacientes com câncer prostático e 86% dos pacientes responderam produzindo anticorpos contra o antígeno tumoral (Todorova e cols., 2005). Conry e colaboradores (2002) mostraram que um plasmídeo de dupla expressão levando CEA e o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) foi utilizado para imunizar 17 pacientes com carcinoma coloretal metastático. A toxicidade foi observada em poucos pacientes, limitada à fadiga, dor no local da injeção e elevação nos níveis de creatina quinase. Doses repetidas de DNA em oito pacientes induziram níveis protetores de anticorpos anti-HBsAg em quatro pacientes, mas a R. I. humoral específica pra CEA não foi observada. Entretanto, quatro dos 17 pacientes desenvolveram resposta linfoproliferativa a CEA, mas não foram observadas respostas clínicas à vacina nesses pacientes.

Os bons resultados dos estudos em animais ainda não puderam ser reproduzidos em ensaios clínicos (Lowe e cols., 2007; Cappelletti e cols., 2003) e a incapacidade das vacinas de DNA induzirem r.i. específica em pacientes pode estar relacionada a captura ineficiente do DNA plasmideal (Lowe e cols., 2007).

Na tentativa de melhorar a baixa eficiência de transfecção, métodos adjuvantes que buscam aumentar a expressão do DNA plasmideal têm sido investigados. Um processo chamado de eletro-transferência de gene, ou de eletroporação (ep) *in vivo* ou ainda de estimulação elétrica que consiste na

aplicação de pulsos elétricos logo após a injeção do plasmídeo tem funcionado como adjuvante físico para aumentar a captura e expressão do gene inoculado (Cappelletti e cols., 2003). Cappelletti e colaboradores (2003) mostraram que grande parte do DNA injetado é degradada quatro horas após a inoculação. A ep, por aumentar a quantidade de DNA que entra na célula muscular, protege o DNA da degradação aumentando a expressão gênica e, conseqüentemente, a eficiência da imunização com DNA plasmideal (Ramos e cols., 2004).

O s.i. também pode induzir uma proteção mais completa pela combinação de imunização genética com formas tradicionais de imunização como a vacina protéica recombinante (Cohen e cols., 1998). Na ausência da proteína recombinante, Nagata e colaboradores (2003) obtiveram anticorpos contra a forma nativa de proteínas de membrana com três imunizações de DNA e uma com células modificadas para expressar o antígeno protéico correspondente.

Na realidade, muitos aspectos devem ser ponderados no desenho de um modelo efetivo de vacina gênica. Alguns deles são a dose, o esquema de reforço, características do antígeno, o vetor a ser utilizado, a rota de entrega e o uso de adjuvantes ou agentes estimulantes. O número de doses afeta a r.i. e um gene muito imunogênico pode requerer apenas uma única dose. Na maioria dos casos, é necessário mais do que uma imunização para promover uma r.i. suficiente para proteção (Doria-Rose e Haigwood, 2003). O intervalo entre as imunizações também pode afetar a r.i. (Prayaga e cols., 1997). Outro ponto em questão é a dose de DNA utilizada. Rr.ii. vigorosas puderam ser conferidas em camundongos imunizados pelas vias i.d., i.m. ou i.s., com concentrações de 1 a 100 microgramas de DNA (Yu e cols., 2005; Tonegawa e cols., 2003; Velikovsky e cols., 2000;

Costagliola e cols., 1998). Grandes animais, como primatas não-humanos, necessitam de doses bem maiores e, em humanos, devem ser ainda mais altas (Doria-Rose e Haigwood, 2003).

Diante do panorama exposto e da disponibilidade de algumas construções plasmídeais, propusemos o presente estudo que compara diferentes protocolos de imunização gênica em camundongos. A imunização gênica tem mostrado proteção imune efetiva em vários modelos animais (Han e cols., 2003; Price e cols., 2001; Donnelly e cols., 1995), mas principalmente em camundongos porque são os animais mais usados em estudos para o entendimento de dados chave da r.i. (Schunk e Macallum, 2005). Também pudemos dispor de dois tipos de plasmídeos: o vetor pVAX, disponível comercialmente, que foi modificado em nosso laboratório para dar origem ao vetor uP (Sacramento e cols., 2007). O vetor uP foi projetado para transfecção *in vivo* e contém o promotor hCMV e o sinal poliA do BGH que, como já comentamos, aumentam o nível de expressão de proteína na maioria dos tecidos de mamíferos. Avaliamos no estudo a r.i. humoral a três antígenos: *human Vascular Endothelial Growth Factor 165* (hVEGF165), isoforma abundante da família de glicoproteínas hVEGF que apresenta potente atividade angiogênica fisiológica ou associada a condições patológicas e é altamente conservada em mamíferos (Ashikari-Hada e cols., 2005; Ferrara, 2001); *human Fibroblast Growth Factor-2* (hFGF-2), que faz parte de uma grande família de fatores de crescimento encontrados desde nemátodes até humanos (Ornitz e Itoh, 2001; Bikfalvi e cols., 1997) e é também um potente fator angiogênico; e o inibidor de serina protease extraído de *Bauhinia bauhinioides* (BbKi), de origem filogenética distante (Araújo e cols., 2005). As três construções plasmídeais foram

utilizadas na imunização de animais via i.s., via i.m., via i.m. seguida de ep e via i.m. seguida de ep em animais pré-imunizados com células modificadas para expressar os diferentes antígenos.

II. Objetivos

Foram objetivos desse estudo:

- 1 – Comparar os diferentes esquemas de imunização para estabelecer um protocolo mais eficiente para obtenção de anticorpos.
- 2 – Verificar se é possível estabelecer um protocolo que funciona de forma equivalente para antígenos com potenciais imunogênicos distintos.

II. Materiais e Métodos

1. Materiais

1.1 Animais

Grupos de cinco camundongos Balb/c fêmeos, com oito semanas de idade foram obtidos do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia), criados e mantidos no biotério do Edifício de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de São Paulo. Toda a experimentação animal foi feita de acordo com as recomendações do *NIH-Guidelines* para o cuidado e uso de animais de laboratório, e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP181/06).

1.2 Vetores

O vetor utilizado para transfecção celular *in vitro* foi o pcDNA3 (*Invitrogen, California, EUA*).

Os vetores utilizados nas imunizações foram o pVAX (*Invitrogen*) e uP, desenvolvido em nosso laboratório (Sacramento e cols., 2007). O vetor uP é uma modificação do vetor pVAX, onde o promotor hCMV foi substituído pelo promotor/*enhancer* do citomegalovírus humano (hCMV com íntron 1) com sinais de *splicing* entre o promotor CMV e sítios de policlonagem do vetor pVAX.

Vetor uP-hVEGF: a construção desse vetor foi feita através da inserção do gene do fator de crescimento do endotélio vascular humano 165 (hVEGF165) (Guo e Qu, 2001) no vetor uP entre os sítios Eco RI e Eco RV.

Vetor uP-hFGF: a construção desse vetor foi feita através da inserção do gene do fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF-2) (Oliveira e cols., 2001) no vetor uP no sítio Eco RV.

Vetor uP-BbKi: a construção desse vetor foi feita através da inserção do gene do inibidor de protease *Bauhinia bauhinioides* (BbKi) (Araújo e cols., 2005) no vetor uP no sítio Eco RV.

1.3 Imunógenos

Diferentes imunógenos foram utilizados nesse estudo:

- vetor uP carregando os genes hVEGF165, hFGF-2 ou *BbKi*.
- células A293T transfectadas com o vetor pcDNA3 carregando os genes hVEGF165, hFGF-2 ou *BbKi*.
- vetor pVAX carregando o gene hVEGF165.
- proteína recombinante BbKi.

1.4 Anticorpos e antígenos

Foram utilizados nos experimentos os anticorpos anti-hVEGF (*Peprro Tech Mexico*, S.A. de C.V.) e soro de coelho anti-hFGF, gentilmente cedido pelo Instituto Butantan. Os antígenos utilizados foram hVEGF (*Peprro Tech Mexico*, S.A. de C.V.), hFGF, gentilmente cedido pelo Instituto Butantan (Oliveira e cols., 2001),

e BbKi (Araújo e cols., 2005), gentilmente cedido pela Dra. Maria Luísa Vilela Oliva da UNIFESP.

1.5 Bactéria

Bactérias da linhagem DH5 α (Hanahan, 1985) foram utilizadas na produção em grande escala dos plasmídeos e cultivadas em meio de cultura *Luria Bertani* (LB) contendo 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl em quantidade suficiente para (q.s.p.) 1 litro. Para transformação, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura SOC (meio LB enriquecido com 20 mM glicose).

1.6 Linhagem celular A293T

Células da linhagem celular renal embrionária humana A293T, utilizadas nas transfecções *in vitro*, foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo bicarbonato de sódio 24 mM e suplementado com 2 mM de glutamina, 200 U/ml de penicilina, 200 μ g/ml de estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino. Este meio suplementado foi denominado de DMEM completo (DMEM_c). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

1.7 Reagentes

O *n*-butanol, etanol, ácido acético glacial, acetato de potássio, isopropanol, NaCl, NaOH, KCl, HCl, LiCl, CaCl₂, Na₂HPO₄, H₂SO₄, KH₂PO₄ e ácido cítrico foram adquiridos da *Merck* (*Darmstadt*, Alemanha).

Fosfato de sódio mono e dibásico, hidróxido de sódio (NaOH), dodecil sulfato de sódio (SDS), Trizma base, Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfônico), RNase A, brometo de etídeo, isopropanol, cloreto de céσιο, lisozima, albumina sérica bovina (BSA), anticorpo de cabra anti-IgG murina conjugado com peroxidase e água oxigenada foram obtidos da *Sigma Aldrich Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA).

Quetamina/Xilazina foram obtidas da *Schering-Plough* (Schering AG Co., Alemanha).

O detergente *Triton X-100* foi obtido da *Reagen* (Rio de Janeiro, Brasil) e o detergente *Tween 20*, da *USB Amersham Life Science* (Cleveland, OH, EUA).

A estreptavidina conjugada com peroxidase e o *o-phenyldiamine dihydrochloride* (OPD) foram obtidos da *Pierce* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL., EUA).

1.8 Meios de cultura e suplementos

Os meios de cultura bacteriano LB e celular DMEM, os suplementos peptona, canamicina e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da *Gibco BRL* (Grand Island, NY, EUA).

A glicose foi adquirida da *Merck*.

O dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), L-glutamina, penicilina, estreptomicina, geneticina – G418 e extrato de levedura foram obtidos da *Sigma*.

1.9 Soluções e tampões

Solução para congelamento de células:

- meio de cultura DMEM contendo SFB 50 % (v/v) e DMSO 10 % (v/v).

Tampões para o ensaio imunoenzimático (ELISA):

- Tampão de bloqueio: tampão salina fosfato (PBS) contendo 1 % (p/v) de BSA.
- Tampão de lavagem: PBS contendo 0,05 % (v/v) de *Tween* 20.
- Tampão para OPD: citrato-fosfato 100 mM pH 5,0 contendo 0,05 % (v/v) de água oxigenada.
- Tampão de parada da reação: H₂SO₄ 4 N.

Tampões para extração plasmideal em grande escala:

- solução I: Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 10 mM e glicose 50 mM.
- solução de lisozima: lisozima 10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,0.
- solução II: NaOH 0,2 N e SDS 1% (p/v).
- solução III: 600 ml de acetato de potássio 5 M e 115 ml de ácido acético glacial (q.s.p. 1 litro).

Tampões utilizados para ultracentrifugação em gradiente de césio:

- cloreto de césio: 1 g/ml em TE.
- brometo de etídeo: 1 mg/ml em água.
- *n*-butanol saturado: *n*-butanol saturado com água na proporção 1:1.

Soluções para transfecção:

- Solução de cloreto de cálcio: CaCl₂ 2 mM.

- HBS 2x: 200 µl de HEPES 500 mM pH 7,1, 250 µl de NaCl 2 M e 20 µl de Na₂HPO₄ 150 mM pH 7,0 em água deionizada (q.s.p. 2 ml).

Outras soluções:

- PBS 1x: Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ a 10 mM, NaCl e KCl a 150 mM com pH 7,4.
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM.

1.10 Materiais descartáveis

Os plásticos utilizados na cultura de células bacterianas ou de mamíferos foram obtidos da *Nunc (Naperville, IL, EUA)*; as placas de 96 poços para os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram da *Corning Incorporated (flat bottom high binding) (Cambridge, Canadá)*; os tubos de microcentrífuga de 0,5 e 1,5 ml, micropipetas e ponteiros de micropipetas de 0,01, 0,1 e 1 ml da *Eppendorf (Brinkmann Instruments, EUA)*; os tubos para ultracentrífuga do tipo *quick seal centrifuge tubes* foram comprados da *Beckman (California, EUA)*; os filtros de 0,22 µm foram adquiridos da *Millipore (NY, EUA)*.

1.11 Equipamentos

Foram utilizados durante a execução do trabalho os seguintes equipamentos: centrífuga *Sorvall* modelo RC5Cn *plus (Newtown, EUA)* com rotores SLA3000 e SLA1500; centrífuga refrigerada para tubos cônicos *Hettich Zentrifugen* modelo 16R rotor 1616; microcentrífuga refrigerada *Eppendorf* modelo 5415D; microscópio óptico de contraste de fase *Nikon* modelo *Diaphot 300 (Nikon*

Corp., Japão); espectrofotômetro EL 808 *Ultra Microplate Reader* (Biotek *Instruments, Inc.*, EUA); incubadora de CO₂ *Forma Scientific* modelo 3158 (*Forma Scientific*, EUA); refrigerador –80 °C modelo *Advantage* (*Queue Systems Inc.*, EUA); ultracentrífuga modelo *Optima XL-100K* rotor VTi90; seladora de tubos modelo *sealing quick seal tube* (*Beckman*); eletroporador T820 modelo ECM 830 (modelo número 533) da *BTX-Genetronics* (*California*, EUA), usando o eletrodo *BTX 2-Needle*; homogeneizador modelo *Queue Shaker Orbital* (*Queue Systems Inc.*, EUA); banho para tubos modelo 102 (*Fanem LTDA*, Brasil), *Speed Vac Savant Plus – SC110* (*Savant Instruments, Inc*, EUA).

2. Métodos

2.1 Transformação bacteriana

Aproximadamente 100 ng de DNA foram adicionados a 40 µl de bactérias competentes (*Escherichia coli*, linhagem DH5α) e incubados em gelo durante 30 minutos. Após choque térmico a 42 °C por 90 segundos e incubação em gelo por 5 minutos, 100 µl de meio SOC foram adicionados e as bactérias foram incubadas durante uma hora a 37 °C. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio *LB* contendo ágar e 30 µg/ml de canamicina ou 100 µg/ml de ampicilina por 24 horas.

2.2 Preparação de DNA plasmideal em larga escala e purificação por ultracentrifugação em gradiente de césio

Para a preparação de DNA plasmideal em larga escala, uma colônia de bactéria transformada foi inoculada em 25 ml de meio *LB*, contendo 30 µg/ml de canamicina ou 100 µg/ml de ampicilina e incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 24 horas (pré-cultura). Em seguida, a pré-cultura foi adicionada a 1 litro de meio *LB*, suplementado com o mesmo antibiótico e incubada por 20 horas a 37 °C e 180 rpm. A suspensão celular foi, então, centrifugada a 6000 rpm em centrífuga refrigerada *Sorvall* (rotor SLA3000) por 20 minutos a 4 °C e o precipitado bacteriano ressuspendido e homogeneizado em 100 ml da solução I gelada para manter o equilíbrio osmótico. Em seguida, 100 ml da solução II foram adicionados e a mistura bem homogeneizada foi mantida por 5 minutos à temperatura ambiente. O lisado bacteriano resultante foi neutralizado com 100 ml da solução III gelada, homogeneizado cuidadosamente e mantido no gelo por 30 minutos. Após centrifugação de 30 minutos em 6000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi filtrado, transferido para uma proveta para adição de 1 volume de isopropanol e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Esse material foi, em seguida, centrifugado a 12500 rpm por 30 minutos a 4 °C na *Sorvall* com rotor SLA1500 e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspendido em tampão TE com adição de 1 volume de LiCl 5 M gelado, centrifugado em 5000 rpm por 15 minutos, e, ao sobrenadante que contém o DNA plasmideal, foi adicionado 1 volume de isopropanol. Esse material permaneceu incubado por 24 horas a -20 °C. Após centrifugação de 8000 rpm por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado,

o *pellet* ressuspendido em 1 ml de tampão TE, transferido para tubo de 1,5 ml e incubado em banho-maria por 15 minutos. Após adição de 10 µl de RNase e incubação a 37 °C por 15 minutos, 1 volume de PEG-NaCl foi acrescentado e o material centrifugado a 14000 rpm (microcentrifuga) por 30 minutos a 4 °C. O *pellet* resultante foi secado em estufa e depois ressuspendido em 500 µl de tampão TE pH 8,0.

Seguiu-se então a purificação do DNA plasmideal por ultracentrifugação em gradiente de césio. Para tanto, o DNA foi ressuspendido para o volume final de 4,2 ml de tampão TE, com posterior adição de 4,2 g de CsCl e 300 µl de brometo de etídio (1 mg/ml). A homogeneização foi feita com auxílio de seringa e agulha, o que facilitou a transferência desse material para um tubo de ultracentrífuga, o qual foi vedado com auxílio de uma seladora específica para esses tubos sem formar bolha. O DNA foi centrifugado por 16 horas a 60000 rpm, à temperatura ambiente, em ultracentrífuga (*Beckman Optima XL -100K-* rotor vTi 90). A banda inferior resultante do procedimento foi removida com auxílio de uma agulha 40x16 mm acoplada a uma seringa de 5 ml. O DNA coletado foi lavado com 2 volumes de *n*-butanol saturado em água até total remoção do brometo de etídeo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 3 volumes de água e 2 volumes de etanol 100 % e o material incubado a -20 °C por 14 horas. Após centrifugação de 5000 rpm por 40 minutos a 8 °C, o sobrenadante foi descartado, o DNA ressuspendido em 1 ml de etanol 70 % e, mais uma vez, centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm e 8 °C em microcentrifuga. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, após secagem em *Speed Vac*, foi ressuspendido em 200 µl de PBS. O DNA

resultante dessas preparações foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e a concentração foi determinada pela seguinte fórmula: DNA ($\mu\text{g/ml}$) = DO_{260} x fator de diluição x 50.

2.3 Transfecção com fosfato de cálcio

A transfecção foi baseada no método de coprecipitação com fosfato de cálcio (Sambrook e cols., 1989).

1º dia: as células A293T foram semeadas em placas de cultura de 6 cm de diâmetro, contendo 4 ml de *DMEM*_c, a uma densidade de 5×10^5 células.

2º dia: o meio de cultura das células A293T foi substituído por uma solução contendo os vetores pcDNA3-hVEGF, pcDNA3-hFGF e pcDNA3-BbKi. Para isso, 200 μl da solução A, contendo 10 μg de DNA, foram adicionados gota a gota a 200 μl de solução B, sob agitação suave e constante. A mistura das soluções (A+B) foi deixada em repouso durante 20 minutos e distribuída homoganeamente gota a gota sobre as células que foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após 6 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS e novo meio de cultura *DMEM*_c foi adicionado. As células transfectadas foram selecionadas com geneticina - G418 (1 mg/ ml).

2.4 Imunizações

Camundongos *Balb/c* foram imunizados sempre após anestesia com quetamina (100 mg/ kg) e xilazina (5 mg/ kg). Todas as injeções foram feitas com

seringas de insulina. Nas imunizações i.d., i.m. e i.m. + ep, o DNA plasmideal foi ressuspendido em PBS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Imunização i.d.

Foram injetados 50 μg de DNA plasmideal na derme por sobre o músculo tibial da pata traseira direita.

Imunização i.s.

A pele e o peritônio do flanco esquerdo foram rebatidos para exposição do baço. Em seguida, foram injetados 20 μg de DNA plasmideal em 100 μl de PBS1X (**Figura 1**). A pele e o peritônio foram prontamente fechados com sutura.



Figura 1: Imunização i.s. com DNA plasmideal.

Imunização i.m.

Injeções de 50 µg de DNA plasmideal foram feitas no músculo tibial anterior, obedecendo a orientação longitudinal das fibras, de uma ou ambas as patas traseiras (**Figura 2**).



Figura 2: Imunização i.m. com DNA plasmideal.

Imunização i.m. seguida de ep

Camundongos foram imunizados i.m. com 50 µg de DNA plasmideal, como anteriormente descrito, e a ep procedeu-se logo após a injeção (**Figura 3**). Para tanto, foi utilizado eletrodo constituído de duas agulhas de 0,5 cm de comprimento e 0,5 mm de espessura, distantes 5 mm uma da outra. Foram aplicados três

pulsos elétricos de 50 ms e 100 V/cm cada, com intervalos de 1 ms, em local próximo ao sítio de injeção e em posição perpendicular às fibras musculares.



Figura 3: Imunização i.m. seguida de ep com DNA plasmideal.

Imunização i.p. com células

5×10^6 células transfectadas com vetor pcDNA3 carregando os genes hVEGF165, hFGF-2 ou BbKi foram ressuspendidas em 500 μ l de PBS e injetadas intraperitonealmente nos camundongos (**Figura 4**).



Figura 4: Imunização i.p. com 5×10^6 células.

Imunização subcutânea (s.c.) com proteína

Um grupo de cinco camundongos foi imunizado três vezes subcutaneamente, em intervalos de 21 dias. Para a primeira imunização, o antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de *Freund* e nas duas subseqüentes em adjuvante incompleto de *Freund*. A cada imunização todo animal recebeu 50 µg de BbKi purificado, sendo 50 µl da emulsão do antígeno injetados em cada um de 4 sítios, dois inguinais e dois axilares, sempre próximos às cadeias ganglionares.

2.5 Protocolos de imunização

Quatro protocolos de imunização para cada antígeno foram avaliados em grupos de cinco camundongos Balb/c. Conforme apresentado na **Tabela 1**, os animais submetidos ao esquema do Protocolo I receberam 20 µg de DNA plasmideal em 100 µl de PBS em uma única imunização. No protocolo II, os camundongos receberam 50 µg de DNA plasmideal em 50 µl de PBS para cada músculo tibial anterior (100 µg DNA plasmideal por camundongo) nos dias 0, 14 e 35. As injeções no protocolo III foram realizadas como no protocolo II, com exceção de que os camundongos receberam apenas 50 µg de DNA plasmideal em 50 µl de PBS em apenas um membro e, logo após cada injeção, foi realizada a ep. No protocolo IV, os camundongos receberam via intraperitoneal cinco milhões de células transfectadas ressuspendidas em 500 µl de PBS antes das duas imunizações com os plasmídeos, que foram realizadas nos dias 21 e 42, conforme descrito para o protocolo III.

Tabela 1. Protocolos de imunização:

Número do protocolo	Tempo (dias)				
	0	14	21	35	42
I	is				
II	im	im		im	
III	im+ep	im+ep		im+ep	
IV	ip		im+ep		im+ep
is = injeção intraesplênica (DNA 20 ug/100 ul)					
im = injeção intramuscular (DNA 100 ug/100 ul)					
im + ep = injeção intramuscular + eletroporação (50 ug/50 ul)					
ip = injeção intraperitoneal (5×10^6 células/500 ul)					

2.6 Coleta de sangue

O sangue dos animais foi obtido através de coleta no plexo retro-orbitário. Os soros foram separados e mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

2.7 Titulação dos soros de animais imunizados e quantificação de proteínas em sobrenadante de cultura de células transfectadas

Tanto a titulação dos soros quanto a quantificação de antígenos em sobrenadante de cultura de células transfectadas foram feitas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). No caso da titulação sérica, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μl de solução de antígeno (1 $\mu\text{g/ml}$) por poço em tampão fosfato salina (PBS) e incubadas por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sítios ativos remanescentes do plástico foram bloqueados com 200 μl de tampão de bloqueio por 1 hora à

temperatura ambiente. As diluições dos soros dos camundongos imunizados e pré-ímmunes foram então distribuídas (50 µl/poço) e incubadas por 4 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem para receber 50 µl de anticorpo de cabra anti-IgG murina conjugado à peroxidase diluído 1: 5000 por poço. Após incubação de 1 hora a 37 °C, seguiram-se novas lavagens como já descrito. As reações foram reveladas com o substrato da peroxidase, *o*-phenyldiamine (OPD), diluído em tampão para OPD (3 mg/ml), contendo 0,03 % H₂O₂ (50 µl/poço). As reações foram interrompidas com 50 µl de tampão de parada. As densidades ópticas das reações colorimétricas foram avaliadas por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 492 nm.

Para a quantificação do antígeno no sobrenadante de cultura das células transfectadas, o ensaio foi o mesmo com algumas modificações: as placas de 96 poços foram sensibilizadas com solução de anticorpo, específico para o antígeno supostamente expresso pelas células transfectadas e após o bloqueio dos sítios ativos remanescentes do plástico, 50 µl do sobrenadante de cultura de células transfectadas com o vetor carregando o antígeno ou o vetor vazio foi adicionado puro ou diluído 1 para 1 em tampão BSA 0,1 %. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37 °C e um anticorpo biotilado específico (0,15 µg/ml) foi utilizado para a detecção dos respectivos antígenos. Seguiu-se, então, a adição da estreptavidina-peroxidase diluída 1 para 1000 em tampão BSA 0,1% e incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Uma curva padrão foi obtida, utilizando-se concentrações conhecidas do antígeno.

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* estatístico Prisma *GraphPad* versão 3,0 (*San Diego*, EUA). Experimentos com três ou mais dados foram analisados pelo teste ANOVA (análise de variância) e comparações múltiplas entre as diferentes condições experimentais dentro e entre os grupos pelo pós-teste *Newman-Keuls*.

O teste *T Student* foi usado para comparar a diferença entre duas condições experimentais apenas, como as vias de imunizações i.m. e i.d. e os vetores de expressão pVAX e uP.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes em todos os testes quando $p < 0,05$.

IV. Resultados

1- Comparação entre as vias de imunização i.d. e i.m.

Para a comparação das vias i.d. e i.m., grupos de camundongos Balb/c foram imunizados três vezes, em intervalos de duas semanas, com 50 µg do vetor pVAX carregando o gene hVEGF165. A **Figura 5** mostra que os camundongos imunizados pela via i.m. apresentaram um nível mais elevado de anticorpos e a análise estatística pelo teste *T Student* mostrou que a diferença entre os grupos foi significativa ($P < 0,0001$).

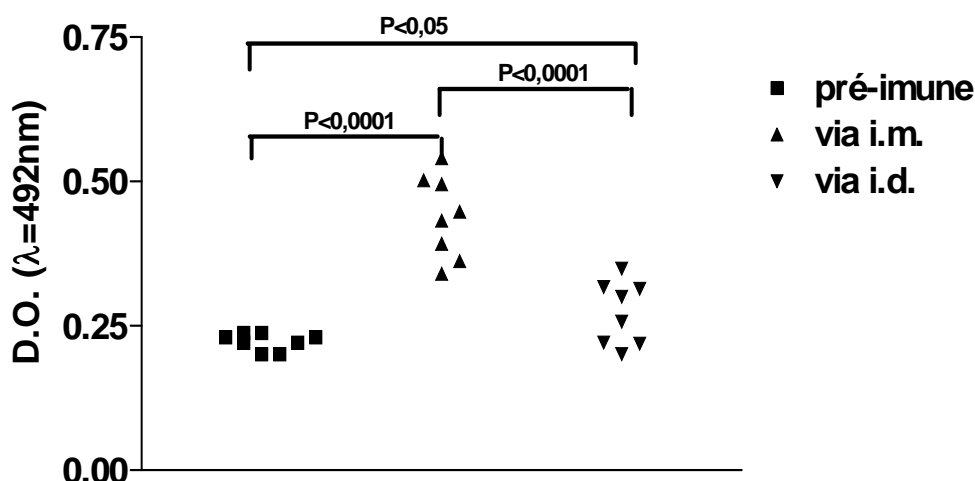


Figura 5: Comparação de r.i. após imunizações via i.d. e i.m.. Soros de camundongos imunizados com pVAX-hVEGF165, conforme indicado na figura, foram testados por ELISA para detecção de anticorpos anti-hVEGF165. São mostrados os resultados obtidos com soros diluídos 1:200, coletados 10 dias após a última imunização. Soros pré-ímmunes foram utilizados como controles negativos (cada ponto representa um animal, Teste *T Student* $P < 0,0001$).

2- Comparação da r.i. humoral após imunizações com gene carregado por diferentes vetores plasmideais

Comparamos a r.i. humoral após transferência *in vivo* do gene hVEGF165 carregado pelos vetores de expressão pVAX ou uP. Camundongos Balb/c foram imunizados três vezes via i.m., em intervalos de duas semanas, com 50 µg do imunógeno. Grupos de camundongos imunizados com uP-hVEGF165 ou pVAX-hVEGF165 produziram níveis similares de anticorpos anti-VEGF165 quando analisados pelo teste T *Student* ($P=0,7276$) (Figura 6).

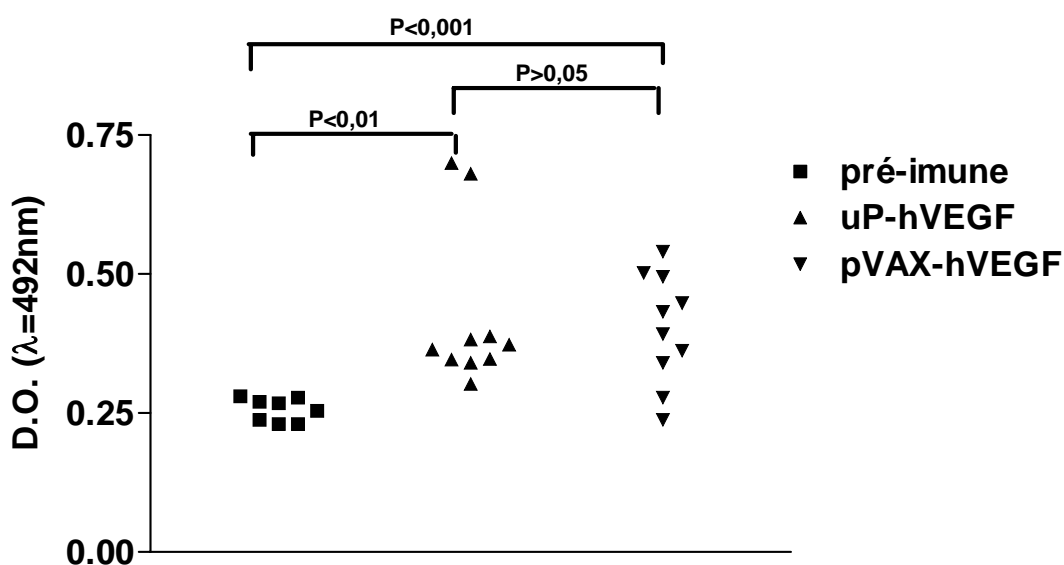


Figura 6: Comparação de r.i. a diferentes vetores. Camundongos foram imunizados via i.m. com os vetores indicados na figura. Soros coletados 10 dias após a última imunização foram analisados por ELISA para detecção de anticorpos anti-hVEGF165. São apresentados os resultados obtidos com a diluição 1/200 dos soros. Soros pré-ímenes foram utilizados como controles negativos (cada ponto representa um animal, Teste T *Student* ($P > 0,05$)).

3- Avaliação da produção de hVEGF pelas células A293T transfectadas com pcDNA3/hVEGF165

Células A293T foram transfectadas com o vetor pcDNA3 carregando o gene hVEGF165, hFGF-2 ou BbKi. As células transfectadas foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^6 células/ml/poço). Amostras de sobrenadantes de cultura das células transfectadas foram colhidas após 24 ou 48 horas. As quantificações foram determinadas por ELISA a partir de curva padrão obtida com concentrações conhecidas do antígeno. Os resultados obtidos para VEGF165 mostram que as células secretaram $2,5 \pm 0,1$ ng/ml após 24 h e $4,5 \pm 0,5$ ng/ml após 48 h e são apresentados na **Figura 7**. Amostras de sobrenadantes de cultura de células transfectadas com o vetor vazio foram utilizadas como controle negativo.

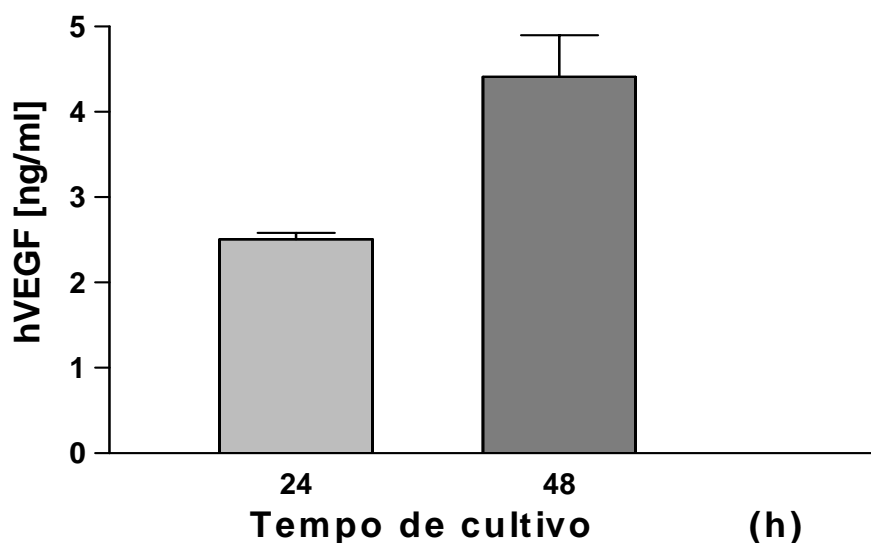


Figura 7: Cinética de produção de hVEGF165 pelas células modificadas com pcDNA3-hVEGF165. Células A293T foram transfectadas com o vetor pcDNA3-hVEGF165 e cultivadas em placas de 24 poços. Após os tempos indicados, amostras dos sobrenadantes de cultura de quatro poços foram coletadas e a concentração de hVEGF165 foi determinada por ELISA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão.

4- Avaliação da r.i. humoral de animais imunizados via i.s.

Grupos de cinco camundongos Balb/c foram imunizados com os genes hVEGF165, hFGF-2 ou BbKI carregados pelo vetor uP. Os animais receberam uma única injeção i.s. de 20 µg de DNA plasmideal em 100 µl de PBS. A imunização i.s. não promoveu r.i. humoral detectável em nenhum dos grupos imunizados avaliados nos dias 15, 30 e 45. Os títulos séricos dos animais imunizados foram comparáveis aos observados com os soros pré-ímmes (Figura 8).

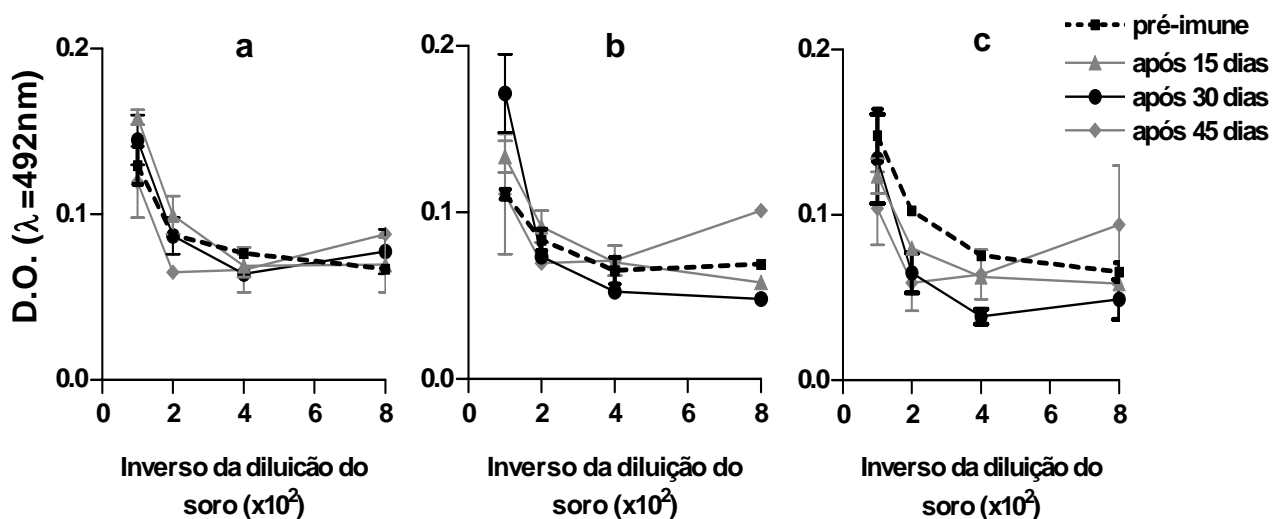


Figura 8: Análise de r.i. após imunização via i.s.. Camundongos receberam uma única imunização via i.s. com o vetor uP carregando os genes hVEGF165 (a), hFGF-2 (b) ou BbKI (c). Os soros foram coletados e diluídos conforme apresentado na figura e testados por ELISA para detecção dos anticorpos específicos. Os resultados são apresentados como a média das absorbâncias obtidas com o soro de cada animal de um grupo a cada coleta ± erro padrão. Soros pré-ímmes nas mesmas diluições foram utilizados como controles negativos (n = 5).

5- Avaliação da r.i. humoral aos protocolos II, III e IV

Titulações séricas foram obtidas 10 dias após cada imunização nos Protocolos II, III e IV (**Tabela 1**). Os resultados observados com o gene hFGF-2 foram representativos para os demais genes utilizados nesse estudo – hVEGF165 e BbKi – e são apresentados na **figura 9**. A **Figura 9a** mostra os resultados obtidos com o protocolo II, apenas injeção i.m., onde se observa um discreto aumento no título de anticorpos após a primeira, segunda e terceira imunizações. Diferentemente, com o protocolo III, que incluiu ep após as injeções i.m. dos genes, um aumento mais acentuado no nível sérico de anticorpos pôde ser observado após cada estímulo (**Figura 9b**). Por outro lado, no protocolo IV, após a primeira imunização feita com a injeção i.p. de cinco milhões de células transfectadas com o gene hFGF-2, nenhum título de anticorpo pôde ser detectado. Aumentos consistentes no nível de anticorpos foram detectados somente após a segunda e terceira imunizações, isto é, após duas imunizações gênicas seguidas de ep (**Figura 9c**).

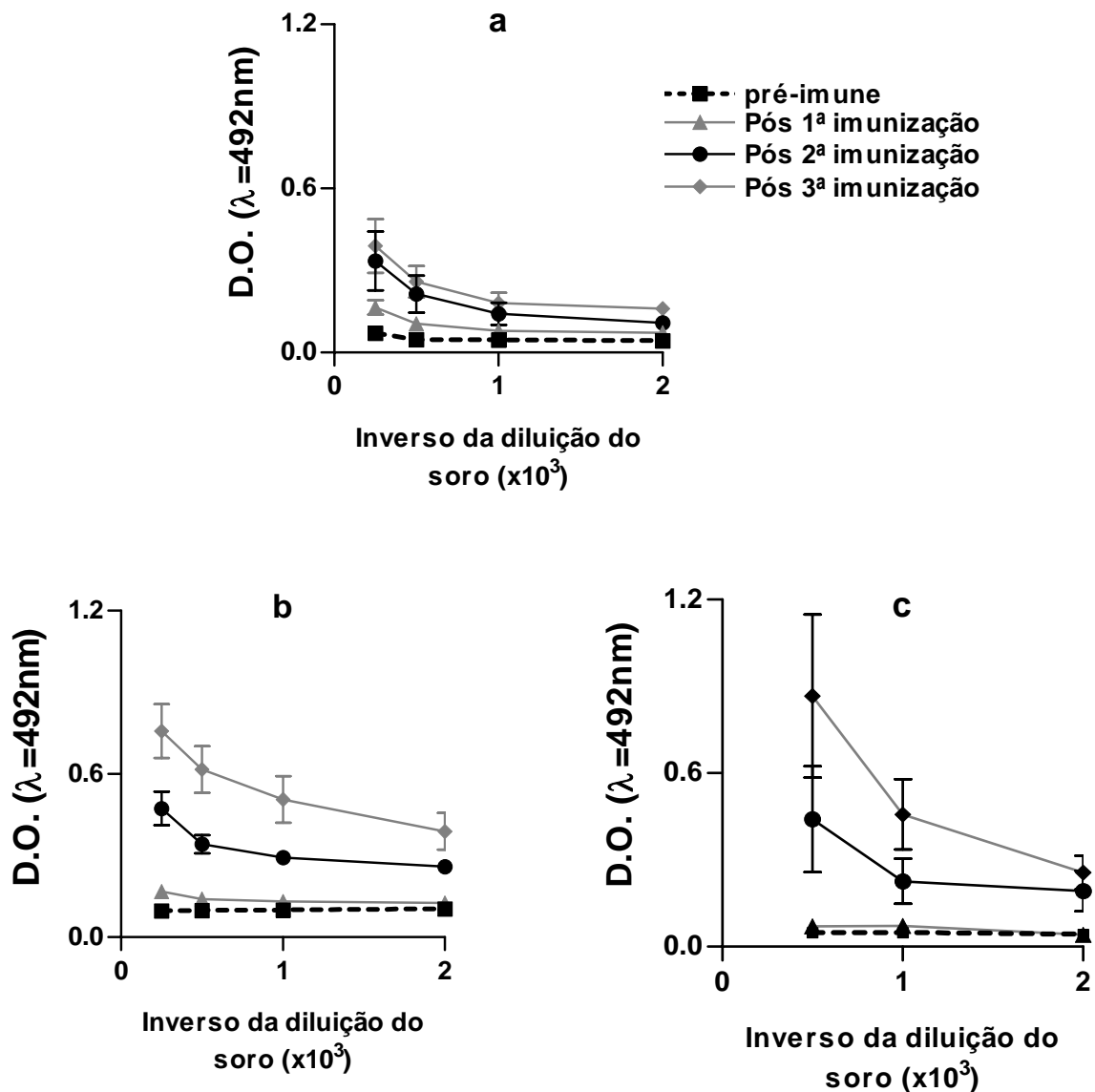


Figura 9: Influência dos reforços nos diferentes protocolos de imunização. Camundongos foram imunizados com uP-hFGF-2, seguindo os protocolos II (a), III (b) e IV (c). Os soros foram testados por ELISA para a detecção de anticorpos anti-hFGF-2. Cada amostra foi testada em duplicatas. Os resultados são apresentados como a média das absorvâncias obtidas com as diluições dos soros colhidos de cada animal 10 dias após cada imunização \pm erro padrão. Soros pré-ímmunes foram utilizados como controles negativos (n = 5).

6- Avaliação da r.i. obtida ao final dos esquemas de imunização propostos nos protocolos II, III e IV

Soros colhidos 10 dias após a última imunização dos protocolos II, III e IV foram avaliados em um mesmo ensaio enzimático para cada um dos antígenos. Na **Figura 10a** são mostrados os resultados obtidos com a diluição 1:1000 dos soros anti-hFGF-2; na **Figura 10b**, os obtidos com a diluição 1:2000 dos soros anti-hVEGF165 e, na **Figura 10c**, os obtidos com a diluição 1:1000 dos soros anti-BbKi. Como se pode observar, imunizações com doses menores do imunógeno utilizadas no protocolo III produziram resultados melhores do que os apresentados pelos animais imunizados pelo protocolo II. Essas diferenças avaliadas pelo pós-teste estatístico *Newman-Keuls* mostrou $P < 0,01$ para hFGF-2 (**Figura 10a**) e $P < 0,05$ para hVEGF165 (**Figura 10b**) e BbKi (**Figura 10c**). Enquanto no protocolo II, 100 µg de DNA plasmideal foram injetados em cada animal a cada imunização (50 µg em cada uma das patas traseiras), no protocolo III apenas 50 µg foram injetados por animal uma única vez a cada imunização.

Quando os resultados obtidos com o protocolo III foram comparados aos do protocolo IV, não houve diferença significativa nos níveis séricos observados. A análise dos dados pelo pós-teste *Newman-Keuls* resultou em $P > 0,05$ para os três antígenos estudados (**Figuras 10a, b e c**).

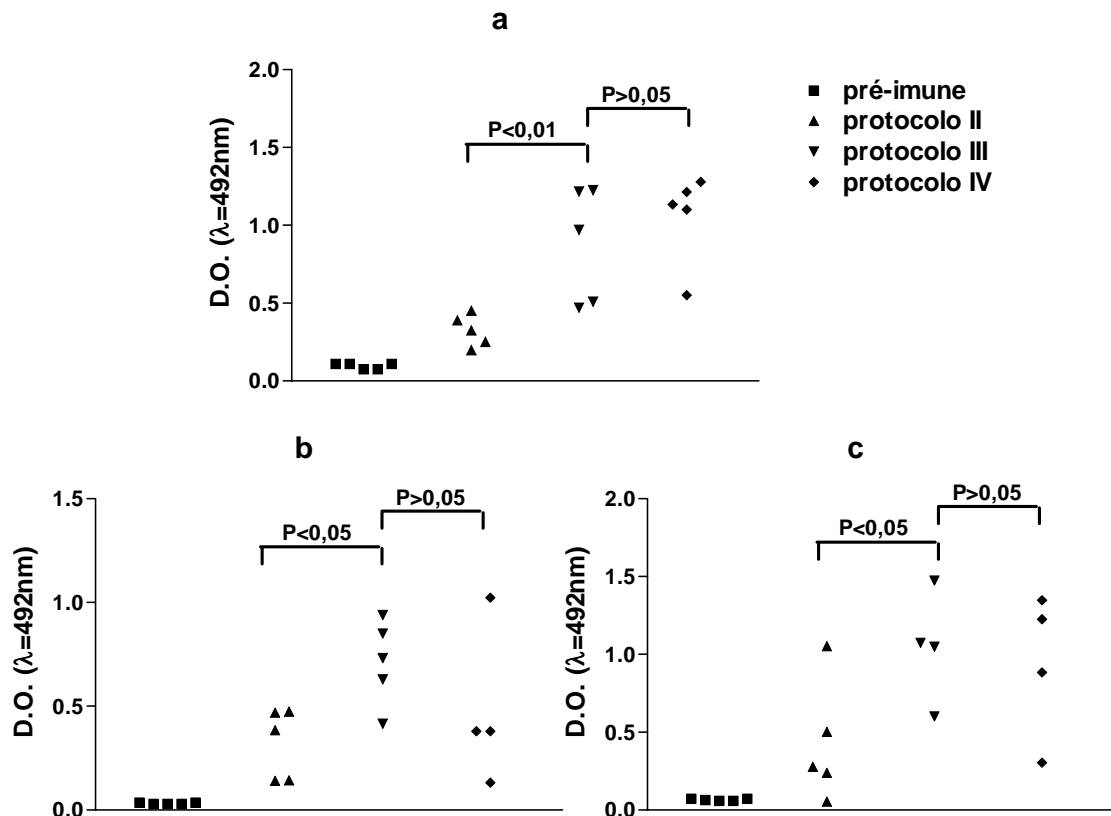


Figura 10: R.i. ao final dos protocolos de imunização. Soros de camundongos imunizados pelos protocolos II, III e IV foram analisados por ELISA para a presença de anticorpos específicos. Os soros foram coletados 10 dias após a última imunização de cada protocolo. São apresentados os resultados obtidos com a diluição 1:1000 dos soros anti-hFGF-2 (a), 1:2000 dos soros anti-hVEGF165 (b) e 1:1000 dos soros anti-BbKi (c). A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA e pós-teste *Neuman-Keuls*. Soros pré-ímmunes nas diluições correspondentes foram utilizados como controles negativos (cada ponto representa um animal).

7- Avaliação da r.i. humoral a um reforço adicional

Animais imunizados com BbKi dos grupos submetidos aos esquemas de imunização dos protocolos II e III receberam mais uma dose do antígeno 21 dias após a terceira imunização. Assim, os animais do protocolo II receberam mais 100 μg de DNA plasmideal (50 μg em cada uma das patas traseiras) e os do protocolo III, apenas 50 μg em uma das patas. Duplicatas de diluições séricas foram analisadas por ELISA e os resultados expressos como média de absorbância \pm erro padrão. Aumento do nível de anticorpos só pôde ser verificado nos animais imunizados de acordo com o protocolo III (**Figura 11**).

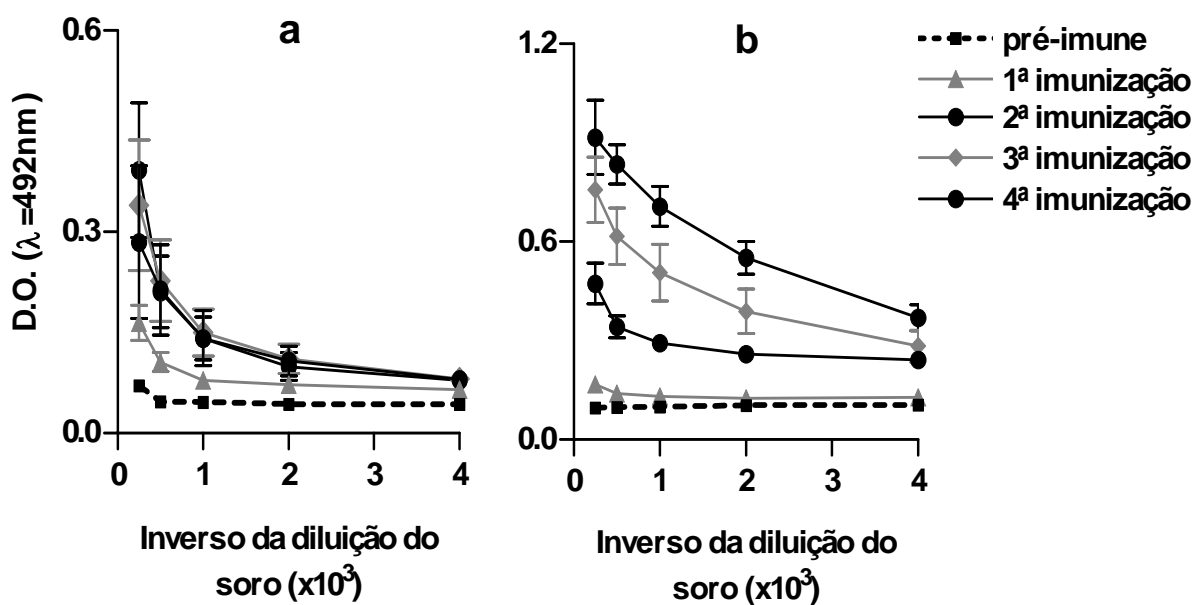


Figura 11: Efeito de um reforço adicional na r.i.. Camundongos receberam mais uma dose reforço com uP-BbKi, de acordo com os protocolos II (a) e III (b). Os soros coletados 10 dias após a quarta imunização foram testados por ELISA e comparados com os soros colhidos 10 dias após cada uma das imunizações anteriores. Os resultados são apresentados como médias das absorbâncias obtidas com os soros de cada animal de um grupo \pm erro padrão. Soros pré-ímmunes foram utilizados como controles negativos.

8- Comparação entre as imunizações gênica e protéica

Soros obtidos de animais imunizados com a proteína BbKi, conforme descrito em Material e Métodos, foram comparados com aqueles obtidos de animais dos protocolos II e III que receberam quatro imunizações. A Figura 8 permite a comparação entre os níveis de anticorpos obtidos após imunização protéica com aqueles observados após dois diferentes protocolos de imunização gênica. A análise estatística desses resultados pelo pós-teste *Newman-keuls* mostrou que não existe diferença significativa entre a imunização protéica e a imunização gênica via i.m. seguida de ep ($P > 0,05$). Porém, quando os soros hiperimunes foram comparados ao soro pré-imune, a potência de cada protocolo tornou-se mais evidente: $P < 0,05$ para injeção i.m. plasmideal, $P < 0,01$ para injeção i.m. plasmideal seguida de ep e $P < 0,001$ para imunização protéica.

V. Discussão

A vacina de DNA é uma alternativa à imunização convencional e se torna opção única nos casos de ausência ou dificuldade na obtenção do antígeno purificado. Muitas vantagens da vacinação gênica sobre a vacinação protéica clássica foram descritas (Sasaki e cols., 2003; Henke, 2002; Donnelly e cols., 1997). Porém, o resultado final da vacinação gênica pode variar e depender de muitos fatores. Dentre eles merece especial atenção a eficiência da entrega gênica, ou seja, a taxa de transfecção e, conseqüentemente, a expressão e exposição do antígeno às células do s.i..

Os fatores que podem influenciar a r.i. à imunização gênica incluem a via de entrega do gene, o vetor utilizado, as características do antígeno, o número de doses e intervalos entre as imunizações, além do emprego de métodos adjuvantes (Wells, 2004; Donnelly e cols., 2003; Hanlon e Argyle, 2001). A imunização gênica pode resultar em proteção contra doenças infecciosas (Montgomery e cols., 1997) ou contra o câncer (Donnelly e cols., 2003; Montgomery e cols., 1997), bem como, permitir a obtenção de reagentes como anticorpos (Leinonen e cols., 2004; Puttikhunt e cols., 2003; Price e cols., 2001).

Para o sucesso de sua execução, entretanto, algumas condições são requeridas. A imunização gênica que utiliza um vetor viral para a entrega do gene de interesse é a abordagem mais utilizada atualmente por apresentar um alto nível de expressão (Liu e cols., 2004; Cappelletti e cols., 2003). Alguns vetores virais são imunogênicos (Tomanin e Scarpa, 2004) e isso pode ser uma vantagem, pois pode servir como adjuvante para estimular a r.i., ou uma desvantagem, porque o

s.i. pode eliminá-los antes mesmo da expressão do antígeno de interesse que carregam. Alguns vírus integram no genoma do hospedeiro (Kohn e cols., 2005, McCarty e cols., 2004; Han e cols., 2003) e isso não é vantagem para a vacinação, pois além do risco de mutagênese insercional (Montgomery e cols., 1997), o s.i. necessita de um período relativamente curto de exposição do antígeno para desenvolver células de memória (Hanlon e Argyle, 2001). Além disso, alguns vírus podem ser revertidos à sua forma virulenta, o que representa risco principalmente para indivíduos imunodeficientes ou imunocomprometidos. A utilização de vetores virais quiméricos tem sido descrita como solução de alguns desses problemas, pois permite unir as vantagens de diferentes vírus selvagens, combinando particularidades convenientes de cada um deles (Tomanin e Scarpa, 2004).

Uma outra forma de entrega do gene é a feita por vetores plasmideais. No presente estudo, optamos pela utilização desses vetores para entregar os genes de interesse. O vetor plasmideal promove a expressão gênica sem integração cromossomal (Wolff e cols., 1992) e é de fácil produção e conservação (Montgomery e cols., 1997). O plasmídeo raramente se integra ao genoma hospedeiro, graças a sua forma circular, e também não replica em células de mamífero. Estudos pré-clínicos mostram que o DNA plasmideal não é imunogênico e, quando purificado e livre de proteínas ou DNA cromossomal bacteriano, não induz anticorpos (Montgomery e cols., 1997). O inconveniente da imunização por vetor plasmideal é a baixa expressão gênica (Peng e cols., 2005; Molnar e cols., 2004), que pode ser contornada pelo melhoramento do vetor de

expressão. Por exemplo, uma construção que carregue um promotor forte como o do hCMV e algumas regiões intrônicas que servem como *enhancers* para o vetor são modificações que aumentam a expressão gênica. Outro ponto importante é a associação do plasmídeo a outras moléculas, como lipossomos, ou a utilização de métodos adjuvantes físicos, como a ep (Wells, 2004).

As vias i.d. e i.m. são as rotas mais comumente utilizadas na imunização gênica (Cohen e cols., 1998). Assim, começamos esse estudo comparando os resultados produzidos quando grupos de camundongos Balb/c foram imunizados via i.d. ou i.m., três vezes, com um vetor plasmídeo comercial pVAX carregando o gene hVEGF165.

Como mostrado na **Figura 5**, a imunização i.m. resultou em nível sérico de anticorpos mais elevado em comparação com a imunização i.d. (teste *T Student*, $p < 0,05$). Sabe-se que na imunização i.m., miócitos são diretamente transfectados e, conseqüentemente, passam a expressar o antígeno codificado pelo gene introduzido. Os miócitos não apresentam moléculas coestimuladoras apropriadas expressas em sua superfície, pois não são APCs profissionais e, portanto, não são eficientes na ativação de linfócitos T. Estudos têm mostrado que, após serem transfectados, além de expressar, e secretar, os miócitos entregam o antígeno a APCs profissionais, pois sofrem apoptose e APCs são recrutadas para o sítio de inoculação em conseqüência da injúria tecidual local provocada pela injeção do plasmídeo. As APCs podem então capturar os *debris* musculares por fagocitose, processar os antígenos endogenamente e apresentá-los a linfócitos T citotóxicos através de moléculas MHC de classe I (Hanlon e Argyle, 2001).

Já a r.i. provocada pela imunização via i.d. está relacionada à transfecção direta de APCs da pele, que aí recebem o nome de células de *Langerhans* (Hanlon e Argyle, 2001). Apesar de a pele apresentar alta quantidade de APCs, o que poderia implicar em um estímulo mais vigoroso do s.i., a correta injeção i.d. pode requerer uma maior habilidade ou treinamento para sua execução (Pavselj e Préat, 2005). Uma provável conseqüência da má administração via i.d. é a inoculação plasmideal no espaço subcutâneo, onde não existem APCs (Hanlon e Argyle, 2001).

Quando analisamos nossos resultados, entretanto, verificamos que o erro padrão foi maior no grupo imunizado via i.m. ($0,4389 \pm 0,0251$) do que no grupo imunizado via i.d. ($0,2723 \pm 0,0194$), o que poderia ser justificado pela captura heterogênea de DNA pelos miócitos com conseqüente variação da expressão gênica. Por outro lado, resta explicar porque a resposta à imunização via i.d. não foi melhor do que a provocada pela via i.m.. Acsadi e colaboradores (1991) mostraram que a injeção de DNA em músculo esquelético ou cardíaco apresentou uma melhor captura e expressão do que a injeção direta em outros tecidos. Estudos mostram que alguns fatores influenciam a captura do DNA por células musculares. Um fator limitante é a distribuição do DNA nas fibras, que pode ser dificultada pelo tecido conjuntivo que circunda as fibras musculares diminuindo, portanto, a quantidade de células transfectadas. Um fator favorável ao aumento da captura e expressão do DNA pelo tecido muscular são os miócitos regenerados resultantes da injúria causada pela injeção (Davis e cols., 1994). Músculos que sofreram necrose e reparo mostraram níveis mais altos de expressão gênica (Donnelly e cols., 2003).

Outro fator que aumenta a captura e expressão do gene é a injeção em miócitos ao longo do eixo longitudinal do músculo e paralelo às miofibras (Levy e cols., 1996). Wolff e colaboradores (1992) apresentaram algumas evidências morfológicas onde a captura do DNA por músculo esquelético de camundongo pode ser através de túbulos T e pequenas invaginações da membrana plasmática celular. Miócitos apresentam um vasto número dessas estruturas, explicando, portanto, porque o tecido muscular internaliza mais DNA do que outros tecidos (Donnelly e cols., 2003).

A r.i. gerada por diferentes vetores plasmidiais foi o ponto seguinte analisado no início do estudo. Para isso, grupos de camundongos Balb/c foram imunizados via i.m. com o gene hVEGF165 carregado pelo vetor pVAX ou uP. O vetor uP foi construído em nosso laboratório a partir do vetor pVAX e contém o promotor, íntron A e *enhancer* do hCMV (Sacramento e cols., 2007). O nível de expressão gênica dos diferentes vetores não afetou a r.i. que foi similar para ambos os vetores (teste *T Student*, $p=0,7276$) (**Figura 6**). Esse resultado não era esperado porque estudos anteriores mostraram que a produção de VEGF induzida por uP-VEGF foi quatro vezes maior *in vitro* e 50% *in vivo* que a do pVAX-VEGF (Sacramento e cols., 2007) o que, em princípio, seria suficiente para provocar uma r.i. mais potente. Uma explicação possível para o nosso achado é que a produção não tenha sido mais alta o suficiente para induzir uma r.i. mais expressiva.

De qualquer maneira, os resultados apresentados nas **Figuras 5 e 6** nos permitiram definir quatro protocolos de imunização a serem testados, usando três genes codificadores dos antígenos hVEGF165, hFGF-2 e BbKi carregados pelo vetor uP.

A possibilidade de uma imunização rápida sem a necessidade de reforços ou adjuvantes e que levasse a uma r.i. suficiente para a produção de anticorpos murinos nos levou a testar a imunização gênica i.s.. Yu e colaboradores (2005) mostraram que uma única injeção i.s. com plasmídeo de expressão em eucarioto carregando o antígeno de interesse foi capaz de induzir anticorpos específicos mais rapidamente que a imunização i.m. de DNA ou protéica convencional. Da mesma forma, outros grupos descreveram resultados positivos com a imunização i.s. (Moonsom e cols., 2001, Velikovsky e cols., 2000). Como mostra a **Figura 8** não conseguimos reproduzir esses resultados, o que pode ser explicado pela pequena quantidade de imunógeno utilizada. Embora, alguns autores tenham obtido resultados com uma única injeção de 20 µg de DNA plasmideal (Velikovsky e cols., 2000), outros utilizaram 100 µg (Yu e cols., 2005) ou necessitaram de reforços adicionais via i.s. ou mesmo i.m. (Ni e cols., 2004).

O aumento na titulação sérica de camundongos após sucessivas imunizações é descrito por alguns autores (Xiao e cols., 2004; Puttikhunt e cols., 2003; Chowdhury e cols., 2001; Donnelly e cols., 1995) e nossos resultados confirmaram esses achados. Na **Figura 9**, onde são apresentados os resultados referentes aos grupos imunizados com o gene hFGF-2 pelos protocolos II, III e IV, representativos para os demais antígenos, foi possível observar o efeito dos reforços. No protocolo II, baseado apenas em injeções i.m. do imunógeno, os aumentos no título de anticorpos foram consistentes embora discretos, enquanto, no protocolo III, onde as injeções i.m. eram seguidas de ep, aumentos expressivos foram observados. Já no protocolo IV, nenhum título de anticorpo pode ser

detectado após a imunização com células transfectadas. Alguns estudos mostram que a combinação de duas modalidades de imunização, como vetor plasmideal mais proteína recombinante, promove um aumento da r.i.. Isto porque essas modalidades podem estimular diferentes vias de apresentação de antígeno (Doria-Rose e Haigwood., 2003). Assim, o antígeno expresso por células transfectadas era esperado provocar forte r.i. humoral. O primeiro argumento, que nos ocorreu, para justificar a não detecção de r.i. seria a expressão *in vivo* insuficiente do antígeno pelas células transformadas. Como mostrado na **Figura 7**, as células transfectadas com pcDNA3–hVEGF165 *in vitro* produziram 2,5 ng de proteína/ 10⁶ células/ 24 horas, o que nos dá uma idéia da potencial capacidade dessas células expressarem o antígeno e indica uma quantidade suficiente para estimular o s.i., pelo menos no caso de um antígeno fortemente imunogênico. No entanto, o resultado obtido com o antígeno BbKi foi similar aos observados com hVEGF165 e hFGF-2. Assim, a não detecção da r.i. humoral em nossas condições após a injeção com células A293T transformadas pode estar relacionada à origem humana dessa linhagem celular, capaz de estimular o s.i. dos camundongos que, em resposta, eliminaria as células injetadas, antes que elas pudessem expressar o antígeno por período adequado. Um aumento consistente no nível de anticorpos, entretanto, foi observado após a segunda e a terceira imunizações. Interessantemente, ao final, os resultados no protocolo IV foram comparáveis àqueles observados com o protocolo III (**Figuras 9 e 10**). Apesar da imunização com células transfectadas não ter induzido r.i. humoral detectável contra os antígenos, parece que, de alguma maneira, ela melhorou a resposta às duas imunizações gênicas.

A **Figura 10** resume os resultados obtidos com os diferentes protocolos para os três antígenos. A primeira informação relevante fornecida pela figura é que as rr.ii. humorais obtidas com os diferentes protocolos ao antígeno BbKi, teoricamente o mais imunogênico por ser filogeneticamente distante, foram comparáveis às obtidas com os antígenos hVEGF165 e hFGF-2, altamente conservados.

A segunda observação que a **Figura 10** permite é que a ep produziu um efeito importante, principalmente se considerado que a quantidade de DNA plasmideal utilizada no protocolo III foi a metade da utilizada no protocolo II e que o protocolo II incluiu a distribuição da dose mais alta em dois sítios de inoculação, o que sabidamente aumenta a r.i. (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). Esses resultados tornam evidente o efeito adjuvante da ep, que provoca a permeabilização da membrana das células, melhorando a captura do DNA injetado (Wells, 2004; Cappelletti e cols., 2003; Herweijer e Wolff, 2003). De acordo com Wagner e colaboradores (2004), o estímulo elétrico desestabiliza a membrana plasmática o que, por sua vez, permite a passagem direta do DNA para o citoplasma celular, evitando a endocitose e a formação de vesículas de degradação, pois a combinação de uma série de pulsos elétricos permite a formação de poros hidrofílicos. O DNA injetado, obedecendo a um efeito eletroforético, se movimenta através desses poros chegando ao núcleo e, assim, melhora a transfecção plasmideal (Pavselj e Prémat, 2005). Além disso, diferente de outros tipos celulares, os miócitos têm o núcleo localizado periféricamente e próximo à membrana da célula o que, segundo Cappelletti e colaboradores (2003), facilita a migração do plasmídeo desde a membrana celular até o núcleo. Como consequência, tem-se o

aumento da expressão do transgene e uma maior quantidade de antígeno disponível para estimular o s.i..

Um terceiro ponto a ser comentado a partir da **Figura 10** é que os resultados obtidos com os protocolos III e IV foram comparáveis. Apesar de não ter sido detectada r.i. humoral após a injeção com células transfectadas para expressar o antígeno de interesse (**Figura 9**), essa imunização parece ter sensibilizado células imunes que foram capazes de responder mais prontamente às imunizações gênicas que foram feitas posteriormente.

Na **Figura 11** mostramos que um reforço adicional nos protocolos II e III pode elucidar se esgotamos ou não a potencialidade desses dois esquemas de imunização. O título de anticorpos anti-BbKi aumentou consideravelmente no protocolo III, enquanto no protocolo II não parece ter provocado qualquer aumento. Entretanto, a questão dos reforços merece atenção e cuidado pois, de acordo com Schunk e Macallum (2005), o aumento da dose e a frequência do reforço não necessariamente aumentam a concentração e a avidéz de anticorpos e, em alguns casos, desencadeia efeito oposto.

Para finalizar, comparamos a r.i. à vacina gênica com aquela obtida pela imunização protéica. Sabe-se da literatura que a r.i. humoral induzida por vacina de DNA em estudos clínicos é relativamente baixa comparada àquela induzida pela injeção direta de proteínas associadas a adjuvantes (Donnelly e cols., 2003). Assim, soros anti-BbKi obtidos após a quarta imunização gênica foram comparados com os de animais imunizados três vezes com a proteína BbKi. A imunização com proteína foi feita conforme protocolos convencionais de imunização, que utilizam adjuvantes. Foi interessante notar que, embora a

imunização protéica tenha promovido altos níveis de anticorpos, a imunização i.m. seguida de ep não desapontou e produziu uma resposta comparável. A análise estatística não conseguiu detectar diferença entre os soros do protocolo III e os obtidos pela imunização protéica. Na verdade, as comparações desses soros hiperimunes com o pré-imune é que revelam a potencialidade de cada protocolo de imunização (**Figura 12**).

No conjunto, os resultados apresentados nos permitiram selecionar como melhor o protocolo III, administração i.m. de DNA seguida de ep, que funcionou igualmente bem para os três antígenos estudados. O protocolo IV, embora tenha produzido resultados comparáveis, envolve o cultivo e transfecção *in vitro* de células que, além de mais trabalhoso é bem mais dispendioso. Esses resultados ganham importância, na medida em que reforçam a idéia de que imunização gênica é uma alternativa promissora quando o antígeno purificado é um fator limitante. Como a tecnologia da vacina de DNA permite a manipulação de seqüências antigênicas, o desenho do vetor pode incorporar genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimuladoras entre outras para aumentar a imunogenicidade da vacina de DNA (Garmory e cols., 2003 e Han e cols., 2003).

Existem campos que podem se beneficiar especialmente dessa tecnologia e a imunoterapia do câncer decididamente é uma delas, como já apontado por outros autores (Lowe e cols., 2007; Liu e cols., 2004). Nessa direção, descrevemos recentemente uma vacina de DNA anti-idiotipo capaz de mimetizar o antígeno tumoral carcinoembrionário (Pignatari e cols., 2007).

Nossos resultados mostram que a ep após a injeção i.m. aumenta significativamente a r.i. e que a imunização gênica acompanhada ep é melhor do que a administração i.m. apenas e equivalente à imunização protéica.

Finalmente, a imunização com DNA pode ser utilizada na produção de anticorpos e os resultados aqui apresentados certamente contribuíram para estabelecer nossas condições de imunização com plasmídeos.

VI. Conclusões

1. Em nossas condições, a imunização gênica via i.m. mostrou melhores resultados do que pela via i.d. e as r.i. humorais à imunização com gene carregado pelos vetores uP e pVAX foram comparáveis.

2. A injeção i.s. não provocou r.i. humoral detectável em nossas condições para nenhum antígeno utilizado.

3. Apesar de não ter sido detectada r.i. humoral após imunização com células modificadas, duas imunizações gênicas seguidas de ep administradas nesses animais produziram resultados comparáveis aos observados nos animais que receberam três imunizações gênicas seguidas de ep, sugerindo que a imunização com células pode ter sensibilizado células do s.i..

4. Todos os protocolos funcionaram de maneira comparável para os três antígenos estudados.

5. A imunização gênica via i.m. seguida de ep induziu r.i. humoral comparável à imunização protéica convencional.

6. A imunização gênica via i.m. seguida de ep foi o esquema mais vantajoso, pois além de promover uma forte r.i. humoral, não envolveu o cultivo de células, transfecção *in vitro* ou injeção de células, o que torna a imunização um procedimento mais simples, rápido, fácil, barato e seguro.

VII. Resumo

A imunização gênica pode contornar alguns problemas encontrados na imunização protéica, quais sejam as dificuldades na obtenção do antígeno purificado e a reatividade da resposta imune (r.i.) com a forma nativa do antígeno. O gene que codifica o antígeno de interesse, carregado por um vetor, é injetado no animal e a proteína é expressa *in vivo*, com a estrutura tridimensional apropriada, favorecendo a produção de anticorpos específicos. Entretanto, o esquema de imunização gênica pode determinar a eficácia da vacina de DNA.

No presente estudo, comparamos quatro protocolos de imunização gênica, usando três antígenos diferentes: dois deles guardam grande homologia na escala filogenética, *human vascular endothelial growth factor 165* (hVEGF165) e *human fibroblast growth factor-2* (hFGF-2), e um de origem vegetal, o inibidor de serina protease extraído de *Bauhinia bauhinioides* (BbKi). Para tanto, grupos de camundongos Balb/c foram imunizados com DNA plasmideal carregando o gene hVEGF165, hFGF-2 ou BbKi. No primeiro protocolo, imunizamos os animais via intraesplênica (i.s.); no segundo, via intramuscular (i.m.); no terceiro, via i.m. seguida de eletroporação (ep); e no quarto, via i.m. seguida de ep em animais pré-imunizados com células modificadas para expressar os respectivos antígenos. Soros de animais imunizados foram analisados por ELISA para detecção da presença de anticorpos anti-hVEGF165, anti-hFGF-2 ou anti-BbKi.

Os resultados mostraram que a imunização i.s. não provocou r.i. humoral detectável em nossas condições. Por outro lado, análises estatísticas indicaram que a ep melhorou muito a r.i. à imunização i.m. e que três imunizações gênicas

seguidas de ep produzem o mesmo efeito que duas da mesma forma em animais pré-imunizados com células transfectadas para expressar o antígeno correspondente. Nossos resultados mostraram que todos os protocolos funcionaram de maneira similar para os três antígenos estudados e que a imunização gênica via i.m. seguida de ep foi o esquema de imunização mais vantajoso. Ainda, a r.i. à imunização i.m. seguida de ep foi comparável à obtida por imunização protéica no caso da proteína vegetal. Finalmente, esses achados permitiram selecionar um protocolo eficiente de imunização gênica que torna possível a obtenção de anticorpos na falta da proteína purificada.

VIII. Abstract

Gene immunization may bypass some difficulties found with protein immunogen, such as the obtainment of purified antigen and the immune response reactivity to its native conformation. Thus, antigen encoding DNA inserted into a vector is inoculated into animal and the protein expressed *in vivo* with the appropriate three-dimensional structure stimulates the production of specific antibodies. However, the gene immunization methods may determine the efficacy of DNA vaccine.

The present study compared four protocols of DNA immunization, using three different antigens: two of them phylogenetically conservative, human vascular endothelial growth factor 165 (hVEGF165) and human fibroblast growth factor-2 (hFGF-2), and other from vegetal origin, Kunitz-type serine protease inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKi). For this, Balb/c mice were immunized with plasmid DNA encoding hVEGF165, hFGF-2 or BbKi genes. In the first protocol, animals were immunized by intrasplenic (i.s.) pathway; in the second, intramuscularly (i.m.); in the third, i.m. injections were followed by electroporation (ep); and in the fourth, i.m. injections followed by ep were performed in animals pre-immunized with antigen-transfected cells. Sera were analyzed by ELISA to detect the presence of anti-hVEGF165, -hFGF-2 or -BbKi antibodies.

Results showed that i.s. immunization did not elicit detectable humoral immune response in our conditions. On the other hand, statistical analyses revealed that the ep improved the immune response to i.m. immunization and that three DNA immunizations followed by ep elicited the same effect obtained by two

i.m. immunizations followed by ep in pre-immunized animals with antigen-transfected cells. Our results showed that all protocols worked similarly for the three studied antigens and that i.m. gene immunization followed by ep was the more advantageous protocol. In addition, the immune response to i.m. immunization followed by ep was comparable to that obtained by protein immunization. Finally, these data allowed us select an efficient DNA immunization protocol that makes possible the antibody obtainment in the lack of purified protein.

IX. Referências bibliográficas

Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. - Cellular and molecular immunology, 5th ed., Saunders, Philadelphia, 2003.

Acsadi, G., Jiao, S., Jan, A., Duke, D., Williams, P., Chong, W., Wolff, J.A. (1991) Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol* 3: 71-81.

Araújo, A.P.U., Hansen, D., Vieira, D.F., Oliveira, C., Santana, L.A., Beltramini, L.M., Sampaio, C.A.M., Sampaio, U.M., Oliva, M.L. (2005) Kunitz-type *Bauhinia bauhinioides* inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of cDNAs, heterologous expression and structural studies. *Biol Chem* 386: 561-68.

Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., Kimata, K. (2005) Heparin regulates vascular endothelial growth factor 165 dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 31508-15.

Belaková, J., Horynová, M., Krupka, M., Weigl, E., Raska, M. (2007) DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Arc Immunol Ther Exp* 55: 387-98.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B. (1997) Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Society Reviews* 18: 26-45.

Breton, M., Zhao, C., Ouellette, M., Tremblay, M.J., Papadopoulou, B. (2007) A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J Gen Virol* 88: 217-25.

Cappelletti, M., Zampaglione, I., Rizzuto, G., Ciliberto, G., La Monica, N., Fattori, E. (2003) Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. *J Gene Med* 5: 324-32.

Chowdhury, P.S., Gallo, M., Pastan, I. (2001) Generation of high titer antisera in rabbits by DNA immunization. *Journal of Immunological Methods* 249:147-54.

Cohen, A.D., Boyer, J.D., Weiner, D.B. (1998) Modulating the immune response to genetic immunization. *FASEB Journal* 12: 1611-26.

Conry, R.M., Curiel, D.T., Strong, T.V., Moore, S.E., Allen, K.O., Barlow, D.L., Shaw, D.R., LoBuglio, A.F. (2002) Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding Carcinoembryonic antigen and Hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clinical Cancer Research* 8: 2782-87.

Costagliola, S., Rodien, P., Many, M.C., Ludgate, M., Vassart, G. (1998) Genetic Immunization Against the Human Thyrotropin Receptor Causes Thyroiditis and Allows Production of Monoclonal Antibodies Recognizing the Native Receptor. *J Immunol* 160: 1458-65.

Davis, H.L., Michel, M-L., Mancini, M., Schleef, M., Whalen, R.G. (1994) Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 12: 1503-9.

Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Liu, M.A. (1995) Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann N Y Acad Sci* 27: 40-46.

Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., Liu, M.A. (1997) DNA VACCINES. *Annu Rev Immunol* 15: 617-48.

Donnelly, J., Berry, K., Ulmer, J.B. (2003) Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *International Journal for Parasitology* 33: 457-67.

Doria-Rose, N. A. and Haigwood, N. L. (2003) DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods* 31: 207-16.

Ferrara, N. (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: 1358-66.

Garmory, H.S., Brown, K.A., Titball, R.W. (2003) DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther* 1: 2-6.

Guo, J. and Qu, S. (2001) Cloning and identification of a novel variant of human vascular endothelial growth factor. *J Tongj Med Univ* 21: 191-94.

Han, S.W., Moraes, J.Z., Silva, C.L., Chammas, R., Rodrigues, M.M. - Artificial DNA: methods and applications. In: Khudyakov, Y.E., Fields, H.A. (Eds.), DNA vaccines, pp. 329-61, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.

Hanahan, D. - Techniques for transformation of *E. coli* in DNA cloning: A practical approach (D.M. Glover, Ed.) vol 1, pp 109-175, 1985.

Hanlon, L. and Argyle, D. (2001) The science of DNA vaccination. *Infect Dis Rev* 3: 2-12.

Henke, A. (2002) DNA immunization – a new chance in vaccine research? *Med Microbiol Immunol* 191: 187-90.

Herweijer, H. and Wolff, J.A. (2003) Progress and prospect: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 10: 453-58.

Hurpin, C., Rotarioa, C., Bisceglia, H., Chevalier, M., Tartaglia, J., Erdile, L. (1998) The mode of presentation and route of administration are critical for the

induction of immune responses to p53 and antitumor immunity. *Vaccine* 16: 208-15.

Huygen, K. (2005) Plasmid DNA vaccination. *Microbes and Infection* 7: 932-38.

Jäger, D. and Knuth, A. (2005) Antibodies and vaccines - hope or illusion? *Breast* 14: 631-35.

Kasinrerk, W., Moonson, S., Chawansuntati, K. (2002) Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. *Hybridoma and Hybridomics* 4: 287-93.

Kohn, D.B., Sadelain, M., Dunbar, C., Bodine, D., Kiem, H.P., Candotti, F., Tisdale, J., Riviere, I., Blau, C.A., Richard, R.E., Sorrentino, B., Nolta, J., Malech, H., Brenner, M., Cornetta, K., Cavagnaro, J., High, K., Glorioso, J. (2005) American Society of Gene Therapy (ASGT) *ad hoc* subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 8: 180-87.

Koide, Y., Nagata, T., Yoshida, A., Uchijima, M. (2000) DNA Vaccines. *Jpn J Pharmacol* 83: 167-74.

- Kupek, E., de Souza, D.E., Petry, A. (2007) Effectiveness of DNA-recombinant anti-hepatitis B vaccines in blood donors: a cohort study. *BMC Infect Dis* 7: 124-29.
- Leinonen, J., Niemelä, P., Lövgren, J., Bocchi, L., Pettersson, K., Nevanlinna, H., Stenman, U.H. (2004) Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. *J Immunol Meth* 289: 157-67.
- Levine, M.M. and Sztein, M.B. (2004) Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nature Immunology* 5: 460-64.
- Levy, M.Y., Barron, L.G., Meyer, K.B., Szoka, F.C.Jr. (1996) Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* 3: 201-11.
- Linden, R.M., and Berns, K.I. (2000) Molecular biology of adeno-associated viruses. *Contrib Microbiol* 4: 68-84.
- Liu, M., Acres, B., Balloul, J.M., Bizouarne, N., Paul, S., Slos, P., Squiban, P. (2004) Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101: 14567-71.

Lowe, D.B., Shearer, M.H., Jumper, C.A., Kennedy, R.C. (2007) Towards progress on DNA vaccines for cancer. *Cell Mol Life Sci* 64: 2391-403.

McCarty, D.M., Young, S.M., Samulski, R.J. (2004) Integration of Adeno-associated virus (Aav) and Recombinant Aav vectors. *Annu Rev Genet* 38: 819-45.

Mohanty, K., Saha, A., Pal, S., Mallick, P., Chatterjee, S.K., Foon, K.A., Bhattacharya- Chatterjee, M. (2007) Anti-tumor immunity induced by an anti-idiotypic antibody mimicking human Her-2/neu. *Breast Cancer Res Treat.* 1: 1-11.

Molnar, M.J., Gilbert, R., Lu, Y., Liu, A-B., Guo, A., Larochelle, N., Orlopp, K., Lochmuller, H., Petrof, B.J., Nalbantoglu, J., Karpati, G. (2004) Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Molecular Therapy* 10: 447-55.

Montgomery, D.L., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Liu, M.A. (1997) DNA Vaccines. *Pharmacol Ther* 74: 195-205.

Moonsom, S., Khunkeawla, P., Kasinrerk, W. (2001) Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic

immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. *Immunol Letters* 76: 25-30.

Nagata, S., Salvatore, G., Pastan, I. (2003) DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J Immunol Meth* 280: 59-72.

Ni, Y., Ma, K., Ni, J., Zheng, X., Wang, Y., Xiong, S. (2004) A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization. *Cellular & Molecular Immunology* 1: 295-99.

Norrby, E. and Prusiner, S.B. (2007) Polio and Nobel prizes: looking back 50 years. *Ann Neurol* 61: 385-95.

Oliveira, M.L.S., Coutinho, J.A., Krieger, J.E., Raw, I., Ho, P.L. (2001) Site-directed mutagenesis of bovine FGF-2 cDNA allows the production of the human-form of FGF-2 in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 14: 1151-57.

Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol Reviews* 2: 3005.1-.12.

- Pavselj, N. and Pr at, V. (2005) DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. *Journal of Controlled Release* 106: 407-15.
- Peng, B., Zhao, Y., Lu, H., Pang, W., Xu, Y. (2005) *In vivo* plasmid DNA electroporation resulted in transfection of satellite cells and lasting transgene expression in regulated muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 1490-98.
- Pignatari, G.C., Takeshita, D., Parise, C.B., Soares, F.A., Moraes, J.Z., Han, S.W. (2007) Carcinoembryonic antigen (CEA) mimicry by an anti-idiotypic scFv isolated from anti-6.C4 hybridoma. *J Biotechnol* 127: 615-25.
- Prayaga, S.K., Ford, M.J., Haynes, J.R. (1997) Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization. *Vaccine* 15: 1349-52.
- Price, B.M., Liner, A.L., Park, S., Leppla, S.H., Mateczun, A., Galloway, D.R. (2001) Protection against Anthrax Lethal Toxin Challenge by Genetic Immunization with a Plasmid Encoding the Lethal Factor Protein. *Infection and Immunity* 7: 4509-15.

- Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Srisa-ad, S., Duangchinda, T., Silakate, W., Moonsom, S., Sittisombut, N., Malasit, P. (2003) Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Meth* 109: 55-61.
- Ramos, J.D.A., Teo, A.S.M., Lee, B.W., Cheong, N., Chua, K.Y. (2004) DNA immunization for the production of monoclonal antibodies to Blot 11, a paramyosin homolog from *Blomia tropicalis*. *Allergy* 59: 539-47.
- Reyes-Sandoval, A. and Ertl, H.C.J. (2001) DNA Vaccines. *Current Molecular Medicine* 1: 217-43.
- Roy-Chowdhury, J. and Horwitz, M.S. (2002) Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther* 5: 340-44.
- Sacramento, C.B., Moraes, J.Z., Tambellini, R., Han, S.W. (2007) Effects of hypoxia response element and DNA targeting sequence in VEGF gene expression. *Molecular Therapy* 15: s184-s184.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. – Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sasaki, S., Takeshita, F., Xin, K.Q., Ishii, N., Okuda, K. (2003) Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 31: 243-54.

Schunk, M.K. and Macallum, G.E. (2005) Applications and Optimization of Immunization Procedures. *ILAR Journal* 3: 241-57.

Seth, P. (2000) Adenoviral vectors. *Adv Exp Med Biol* 465: 13-22.

Shedlock, D.J. and Weiner, D.B. (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 793-806.

Song, K., Chang, Y., Prud'homme, G.J. (2000) Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther* 7: 481-92.

Srivastava, I.K. and Liu, M.A. (2003) Gene Vaccines. *Ann Intern Med* 138: 550-59.

Stover, C.K., Delacruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, W.R., Bloom, B.R. (1991) New use of BCG for Recombinant Vaccines. *Nature* 351: 456-60.

Syrenelas, A.D., Chen, T.T., Levy, R. (1996) DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med* 2: 1038-41.

- Tang, D., De Vit, M., Johnston, S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 153-59.
- Tearina Chu, T.H., Halverson, G.R., Yazdanbakhsh, K., Oyen, R., Reid, M.E. (2001) A DNA-based immunization protocol to produce monoclonal antibodies to blood group antigens. *Br J Haematol* 113: 32-36.
- Theves, G. (1997) Smallpox: an historical review. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb* 134: 31-51.
- Timmerman, J.M., Singh, G., Hermanson, G., Hobart, P., Czerwinski, D.K., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C.B., van Beckhoven, A., Levy, R. (2002) Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Research* 62: 5845-52.
- Timmusk, S., Jansson, E., Pilström, L. (2003) The generation of monoclonal antibodies by genetic immunization: antibodies against trout TCR α and IgG isotypes. *Fish and Shellfish Immunology* 14: 187-206.
- Todorova, K., Ignatova, I., Tchakarov, S., Altankova, I., Zoubak, S., Kyurkchiev, S. Mincheff, M. (2005) Humoral immune response in prostate cancer patients after immunization with gene-based vaccines that encode for a protein that is proteasomally degraded. *Cancer Immun* 5: 1.

Tomanin, R. and Scarpa, M. (2004) Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Current Gene Therapy* 4: 357-72.

Tonegawa, K., Nobusawa, E., Nakajima, K., Kato, T., Kutsuna, T., Kuroda, K., Shibata, T., Harada, Y., Nakamura, A., Itoh, T. (2003) Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza A virus. *Vaccine* 21: 3118-25.

Velikovsky, C.A., Cassataro, J., Sanches, M., Fossati, C.A., Fainboim, L., Spitz, M. (2000) Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies Persistent expression of DNA. *J Immunol Meth* 244: 1-7.

Wagner, E., Kircheis, R., Walker, G.F. (2004) Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58: 152-61.

Wells, D.J. (2004) Gene Therapy Progress and Prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Therapy* 11: 1363-69.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-68.

Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P., Jani, A. (1992) A long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1: 363-69.

Wu, F., Huang, J.H., Yuan, X.Y., Huang, W.S., Chen, Y.H. (2007) Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* 25: 8868-73.

Xiao, S., Chen, H., Fang, L., Liu, C., Zhang, H., Jiang, Y., Hong, W. (2004) Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine* 22: 345-51.

Xue, S.A. and Stauss, H.J. (2007) Enhancing Immune Responses for Cancer Therapy. *Cellular & Molecular Immunology* 4: 173-84.

Yu, X.F., Liang, L.H., She, M., Liao, X.L., Gu, J., Li, Y.H., Han, Z.C. (2005) Production of a monoclonal antibody against SARS-CoV spike protein with single intrasplenic immunization of plasmid DNA. *Immunol Letters* 100: 177-81.

X. Anexo

Anexo 1 - Esquema circular do plasmídeo pcDNA3 de expressão em eucarioto

CMV: promotor e *enhancer* para alto nível de expressão do citomegalovírus (CMV).

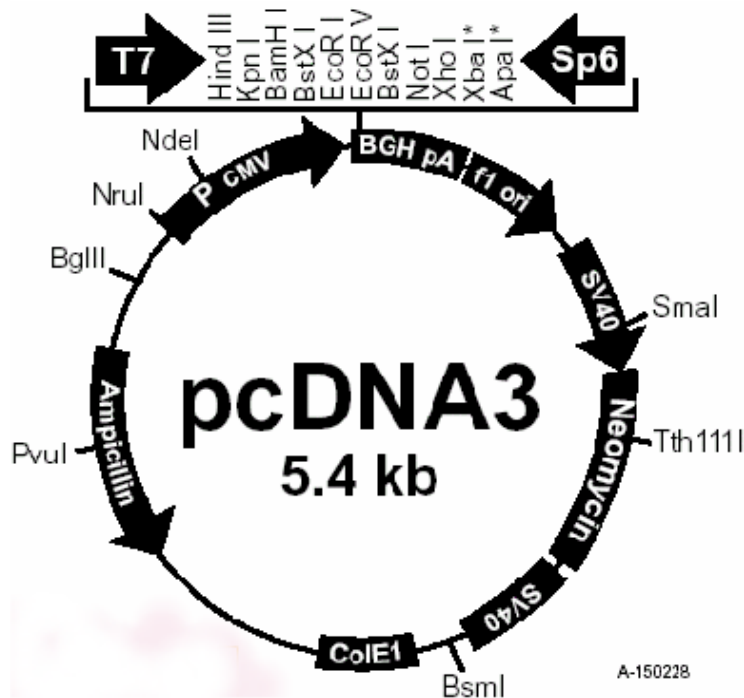
MCS: sítio de clonagem múltipla contendo o sítio de restrição das enzimas.

BGH poliA: sinal de poliadenilação e seqüência de terminação da transcrição do hormônio de crescimento bovino para aumentar a estabilidade do mRNA.

ColE1: origem de replicação do plasmídeo em *E. coli*.

Ampicilin: gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

Neomycin: gene que confere resistência ao antibiótico neomicina (geneticina).



Anexo 2 - Esquema circular do plasmídeo pVAX de expressão em eucarioto

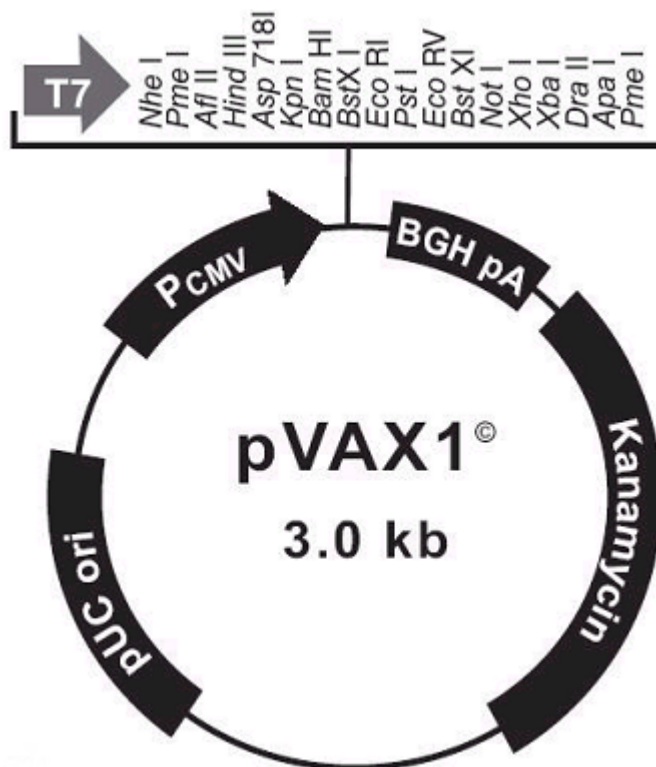
CMV: promotor do citomegalovírus (CMV).

MCS: sítio de clonagem múltipla contendo o sítio de restrição das enzimas (promotor T 7).

BGH poliA: sinal de poliadenilação e seqüência de terminação da transcrição do hormônio de crescimento bovino para aumentar a estabilidade do mRNA.

PUC ori: origem de replicação do plasmídeo em *E. coli*.

Kanamycin: gene de resistência ao antibiótico Kanamicina.



Anexo 3 - Esquema circular do plasmídeo uP de expressão em eucarioto

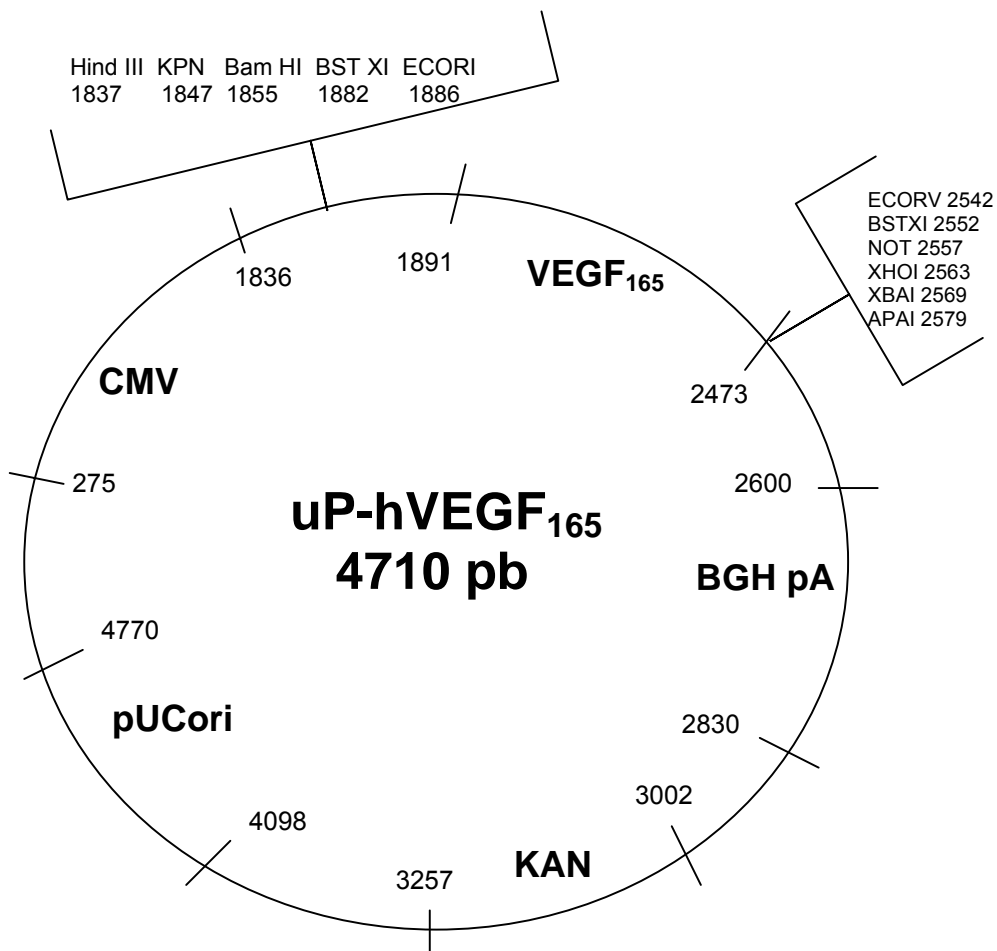
CMV: promotor/*enhancer* do citomegalovírus humano (hCMV com *intron 1*) para alto nível de expressão.

MCS: sítio de clonagem múltipla contendo o sítio de restrição das enzimas.

BGH poliA: sinal de poliadenilação e seqüência de terminação da transcrição do hormônio de crescimento bovino, para aumentar a estabilidade do mRNA.

PUC ori: origem de replicação do plasmídeo em *E. coli*.

Kanamycin: gene de resistência ao antibiótico Kanamicina.



Anexo 4 - Artigo submetido, artigo publicado e participação em congresso