

VACINAS DE DNA E RNA RECOMBINANTE: REVISÃO DE LITERATURA

VACCINES OF RECOMBINANT DNA AND RNA: LITERATURE REVIEW

¹MANCEBO, A.M.; ²OLIVEIRA, B.B.; ³CAMARGO, G.S.; ⁴FIORUCI, J.C.R.;
⁵FERREIRA, M.A.; ⁶STURION, T.T.

^{1a5}Discentes do curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

^{61a5}Docente do curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

As vacinas são componentes essenciais para a profilaxia contra doenças em animais e humanos. Está baseada no uso do agente etiológico no intuito de que ao ser inoculado no hospedeiro provoque uma resposta imunológica, protegendo-o contra futuras doenças. Com o avanço da medicina e da biologia molecular, vem se desenvolvendo vários tipos de vacinas, nas quais muitas ainda estão em teste. Dentre essas inovações estão as vacinas DNA e RNA, no qual a vacina de DNA consiste em inocular o plasmídeo bacteriano em uma célula e em seguida inoculá-la em um hospedeiro, cujo este produzirá uma resposta imune contra o agente inoculado. Uma variação das vacinas de DNA são as vacinas de RNA, que ao ser inoculada no organismo estimulará a síntese proteica deixando-o imunizado. O presente estudo teve como objetivo a revisão de literatura sobre as diversas técnicas de vacinas enfatizando as de DNA e RNA recombinante.

Palavras-chave: Vacinas. Imunologia. DNA. RNA. Recombinante.

ABSTRACT

The vaccines are essential components for the prophylaxis against diseases in animals and humans. It is based on the use of the etiologic agent in order that to be inoculated in the host causes an immune response, protecting it against future diseases. With the advancement of medicine and molecular biology, it has developed various types of vaccines, in which many are still in testing. Among these innovations are DNA and RNA vaccines in which the DNA vaccine is to inoculate the bacterial plasmid in a cell and then inoculating it in a host, which will produce an immune response against the inoculated agent. A variation of the DNA vaccines are RNA vaccines, which when inoculated into the organism, they will stimulate protein synthesis keeping it immunized. This study aimed to review of the literature on several vaccines techniques emphasizing the recombinant DNA and RNA vaccines.

Keywords: Vaccines. Immunology. Recombinant DNA and RNA Vaccines.

INTRODUÇÃO

Quando um agente agressor penetra no organismo, o sistema imunológico utiliza seus mecanismos de defesa para combatê-lo. A função das vacinas é informar o sistema imunológico e fazer com que ele reconheça tais agentes, estimulando a produção de anticorpos específicos para que consiga destruí-los, sem permitir que a doença se desenvolva (TIZARD, 1982).

Para que isso ocorra, às vacinas são preparadas à partir de partes do próprio agente agressor ou de um agente semelhante a ele. Esses microrganismos são

utilizados na forma atenuada, ou seja, enfraquecida ou inativada, para que o indivíduo não desenvolva a doença ou sua forma crônica. (PHILPOTT et al., 2001).

A primeira vacina desenvolvida foi contra varíola, por Edward Jenner no ano de 1796 (BARQUETE et al.,1997) . Anos depois, em 1886 surge a segunda vacina desenvolvida, a vacina contra o vírus da raiva, criada por Louis Pasteur. (OIE, 2011). Ao longo dos anos e com o avanço dos estudos, várias vacinas foram fabricadas, de diferentes tipos e para diversas doenças. Atualmente existem vacinas atenuadas, vacinas inativadas, vacinas combinadas, vacinas conjugadas, bem como as vacinas de DNA e RNA recombinante (PLOTKIN, 2005).

A vacina de DNA é formada a partir de um plasmídeo e a sua expressão contendo genes que codificam um ou mais antígenos imunogênicos de interesse, uma vez que esses plasmídeos recombinantes estiverem dentro da célula hospedeira o gene alvo será transcrito. (SAADE, F.; PETROVSKY, N. ,2012).

As vacinas de RNA recombinante são constituídas por fragmentos de sequência do material genético do RNA mensageiro (mRNA), o qual pode ser destinado para codificar qualquer proteína viral, bacteriana ou parasitária. Sendo assim quando o mRNA do vírus está dentro das células do hospedeiro são traduzidos em proteínas, as quais induzem uma resposta imunológica ao organismo do hospedeiro. (CHAHAL JS, et al., 2016).

Ao passo que as sequências de RNA/DNA sejam personalizadas, pesquisadores podem criar vacinas que produzam praticamente qualquer proteína desejada.

O presente trabalho teve como objetivo a revisão de literatura referente as vacinas, com ênfase as vacinas de DNA e RNA, bem como as suas vantagens em relação as demais vacinas.

METODOLOGIA

As bases de dados utilizadas para o devido trabalho foram: Scielo, Google Acadêmico, nos quais foram encontrados vinte e oito artigos científicos dos quais foram utilizados 9. Livro de Virologia Veterinária do autor Eduardo Furtado Flores; Livro Imunologia Roitt, Brostoff, Male, cujo foram retirados conteúdos dos capítulos referentes às vacinas.

DESENVOLVIMENTO

REVISÃO DA LITERATURA

História das Vacinas

No início do século XVIII a varíola era uma doença que causava um número elevado de mortes em crianças, e as que não morriam ficavam muitas vezes cegas e com muitas cicatrizes. E desde o século X, a China tenta-se prevenir da doença, praticando a variolização. Esta técnica consistia na inoculação em crianças por escarificação de material seco das lesões de varíola. (HMSO, 1996).

Em 1796 o médico inglês Edward Jenner, após inúmeras observações, percebeu que as trabalhadoras que ordenhavam as vacas, que tinham frequentemente lesões nas mãos semelhantes às pústulas da varíola, não eram contagiadas quando havia um surto de varíola. Assim Jenner testou a sua teoria num garoto de oito anos, James Phipps. Com o líquido de uma pústula da mão de uma das ordenhadoras que apresentava nas mãos lesões pustulosas, inoculou esta no garoto. Algum tempo depois inoculou a varíola humana e ele não adoeceu. (BARQUETE et al.,1997)

A origem do nome “vacina”, veio do termo “varíola da vaca”, em latim: “*variola vaccinae*” que, com o tempo, acabou popularizado no termo “inoculação da vacina”. (MIMS,1998).

O trabalho de Jenner representou a primeira tentativa científica de controlar uma doença infecciosa pelo uso de uma vacina. Menos de 200 anos depois da vacinação do pequeno James Phipps, foi registado o último caso de varíola numa pequena aldeia da Somália em 26 de Outubro de 1977. (NAZ, 1999).

Com base nos princípios de Edward Jenner, Louis Pasteur em 1885 criou vacinas contra alguns infectantes. As vacinas de Pasteur contribuíram de forma significativa, as principais foram: a vacina contra cólera aviária e a vacina contra raiva. (OIE, 2011).

Por fim em 8 de Maio de 1980 a Organização Mundial de Saúde certificou a erradicação da varíola da face da terra. (MIMS,1998).

Desenvolvimento das vacinas

O desenvolvimento de vacinas depende fundamentalmente do conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em resposta às infecções. (NETO et al., 1991).

A primeira interação entre o patógeno e o hospedeiro é através da barreira mecânica, entre os meios externo e interno, dificultando ou impedindo a adesão dos patógenos à superfície das células epiteliais de revestimento. (BARASCHI ET AL., 2003). Estas células expressam diferentes receptores, que reconhecem os receptores dos patógenos e se ligam, dando início ao processo de ativação celular e humoral. (PHILPOTT et al., 2001).

O objetivo da imunização ativa é induzir imunidade protetora (imunogenicidade) sem patogenicidade, gerando memória imunológica. E a vacina é uma forma de imunização artificial ativa. (TIZARD, 1982).

As células de memória permitem ao sistema imune elaborar uma resposta de melhor qualidade e maior intensidade a partir do segundo contato com o antígeno. Esta resposta secundária é mais rápida e mais eficiente do que a resposta primária. (RAMASAY et al., 1999).

O objetivo no desenvolvimento da vacina é alterar o patógeno ou suas toxinas de tal modo que eles se tornem inócuos sem perder a antigenicidade. Isto é possível por que os anticorpos reconhecem determinadas partes dos antígenos, os epítomos, e não o organismo ou a toxina como um todo. (PHILPOTT et al., 2001).

Há vários tipos de antígenos utilizados na preparação de vacinas. Os principais são a base de: microrganismos vivos atenuados, inativados, toxóides, recombinantes e DNA. (PLOTKIN, 2005). Nas vacinas atenuadas os micro-organismos perdem sua patogenicidade, mas retêm a capacidade de crescimento transitório no hospedeiro inoculado. O seu crescimento transitório permite a exposição prolongada do sistema imune à epítomos do micro-organismo, resultando em imunogenicidade aumentando a geração de células de memória. Em consequência, uma única imunização costuma ser suficiente, não necessitando muitas vezes de reforço. (MOTA et al., 2009).

Nas vacinas a base de microrganismos inativados, os patógenos podem ser inativados quimicamente por formol, fenol e timerosal, tornando-se incapaz de se replicar no hospedeiro, atuando como antígeno exógeno. A vacina inativada já requer reforços repetidos para manter o estado imune do hospedeiro e induz

predominantemente imunidade humoral, sendo menos eficaz em induzir imunidade celular. (OSHOP et al., 2002)

Produzidas através da purificação da exotoxina, as vacinas toxóides, são formadas pela inativação das toxinas do patógeno através do formaldeído. Elas mantêm a mesma imunogenicidade da toxina, porém sem causar a doença, exemplo a vacina de tétano. Porém esta purificação não deve modificar excessivamente a estrutura do epítipo. Esta vacina induz formação de anticorpos anti-toxóide, que também se ligam à toxina, neutralizando seus efeitos. (LUZ, 2007).

As vacinas recombinantes (gênicas) são feitas a partir de vírus geneticamente manipulados, os quais contêm genes de outros vírus. Os vírus mais utilizados para a produção da vacina são aqueles com genoma extenso. Na fabricação da vacina, primeiramente são eliminados quaisquer genes que não sejam essenciais para a replicação viral. Em seguida, são introduzidos os genes de outros vírus. O resultado é um vírus recombinante, que codifica (produz a partir do seu DNA) o antígeno, isto é, a substância que irá induzir a produção dos anticorpos que inativam o vírus causador da doença. (RAHMAN et al., 2008).

Vacina de DNA

No decorrer dos anos, diversos métodos de vacinação foram desenvolvidos, como as vacinas que utilizam organismos vivos e atenuados, organismos mortos ou inativados, fragmentos subcelulares e toxóides. (ROITT ET AL 1997, SILVA 1997, AZEVEDO & OLIVEIRA 1998, SILVA 2000, SIMMERMAN 2002).

A vacina de DNA foi descrita em 1990, quando o plasmídeo contendo um gene repórter que codifica a β -galactosidase expressou a proteína após a inoculação direta no músculo de camundongos. (WOLFF et al., 1990). Este estudo avaliou fatores que determinam a eficiência da transferência do gene e da imunogenicidade conferida pela inoculação do plasmídeo. Posteriormente, a inoculação de DNA que codifica uma proteína imunogênica do vírus influenza conferiu imunidade protetora em camundongos. (ULMER et al., 1993). A partir destes resultados, o entendimento sobre o mecanismo imunológico induzido por este tipo de vacina despertou interesse da comunidade científica.

Vacinas de DNA mostraram serem efetivas para várias doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e também para tumores. Conseqüentemente, esse tipo de vacina contribui para o controle de doenças infecciosas, parasitárias e na terapia oncogênica em medicina humana e veterinária. (ULMER et al., 2006).

A primeira vacina gênica testada em modelos animais foi a vacina contra o vírus influenza. (DONNELLY & ULMER 1999). Desde 1990, a vacina gênica vem sendo testada em uma variedade de modelos animais - rato, gado, cachorro, furões, e primatas não humanos - contra diferentes patógenos, como vírus da imunodeficiência humana, hepatite, malária, tuberculose, herpes simplex (OLIVEIRA ET AL 1999), vírus da coriomeningite linfomonocitária, vírus sincicial respiratório bovino (SILVA 2000), dengue, tétano (DONNELLY & ULMER 1999), esquistossomose (LIMA ET AL 2000), vírus de raiva, papilomavírus e neoplasias (SRIVASTAVA & LIU 2003).

Desenvolvimento

Entre as vacinas de DNA para infecções bacterianas, a vacina para o controle da tuberculose humana e bovina foi uma das primeiras vacinas estudadas. O antígeno MPB83 do *Mycobacterium bovis* demonstrou boa proteção em camundongos imunizados quando desafiados com cepas virulentas e estimulou resposta mista de IgG1 e IgG2a. Posteriormente, a imunogenicidade da vacina foi avaliada em bovinos que apresentaram alta taxa de resposta proliferativa ao antígeno MPB83. (CHAMBERS et al., 2000).

Este tipo de vacinação apresenta uma grande vantagem, pois fornece para o organismo hospedeiro a informação genética necessária para que ele fabrique o antígeno com todas as suas características importantes para geração de uma resposta imune. Isto sem os efeitos colaterais que podem ser gerados quando são introduzidos patógenos, ou os problemas proporcionados pela produção das vacinas de subunidades em microrganismos.

A captação do DNA plasmidial pelas células após a injeção é ineficiente. Somente uma pequena proporção do material injetado é internalizada pelas células que resulta em sucesso na transfecção, isto é, produção de antígeno pelas células do animal vacinado. Entretanto, duas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a potência da vacina: i) liberação física para alcançar altos níveis de antígenos e ii) formulação com

micropartículas para células alvo apresentadoras de antígenos (APCs). (ULMER et al., 2006).

A administração de uma única dose de plasmídeo pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+, os quais secretam citocinas e têm função reguladora na produção de anticorpos. (KOWALCZYK; ERTL, 1999). O sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e via de administração, da concentração de DNA administrada, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático), da idade e saúde do hospedeiro e da espécie dos animais vacinados. (RAINCZUK et al., 2003; MOREL et al., 2004; ROBINSON, 1997; FYAN et al., 1993). As vacinas de DNA, em teoria, representam uma metodologia que se aproxima da infecção natural, alcançando a indução da proteção desejada.

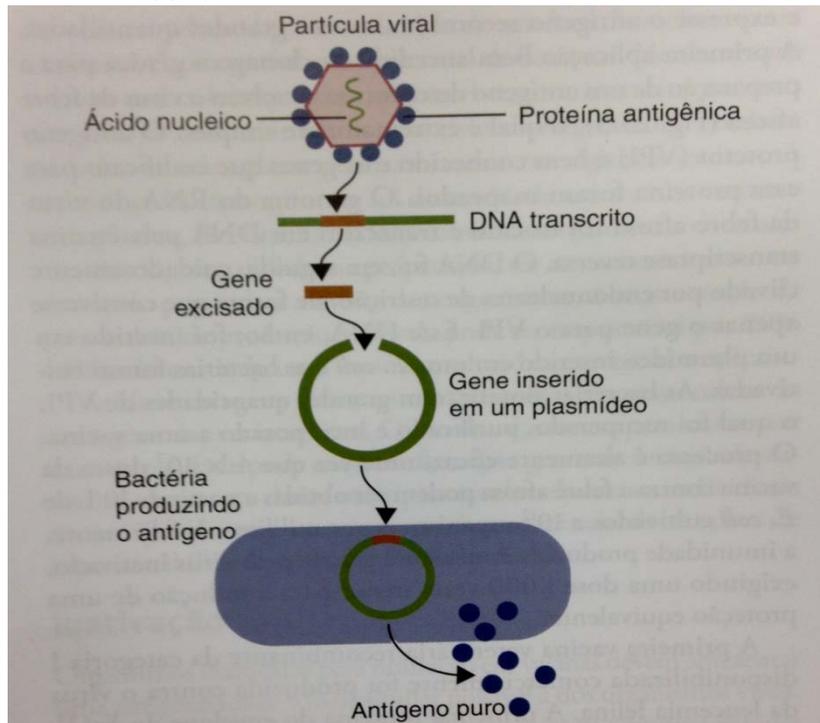
A vacina é baseada na tecnologia do DNA recombinante que envolve a transferência de um determinado gene (transgene), que codifica uma proteína (imunógeno), dentro de um vetor de expressão para células eucarióticas. (WAINE; McMANUS, 1995).

E os passos para esta fabricação são:

- 1) extração do DNA;
- 2) purificação do DNA;
- 3) recombinação gênica;
- 4) transformação bacteriana;
- 5) amplificação/ clonagem;
- 6) triagem;
- 7) isolamento.

O procedimento da elaboração dessa vacina, empregando a tecnologia do DNA recombinante, inicia-se com a extração do DNA de um microrganismo que pode ser um vírus, uma bactéria, um fungo ou um parasita, a fim de obter deles o gene codificador da proteína antigênica. E a extração de um DNA plasmidiano de uma bactéria *E. coli*, bactéria do trato gastrointestinal, o qual servirá como vetor que carregará o gene do patógeno. Como ilustra a imagem a baixo (figura 1) as etapas de produção das vacinas de DNA recombinante.

Figura 1. Produção de uma proteína viral recombinante para uso em vacina.



Fonte: Ian R. Tirzard, *Imunologia Veterinária*; 2013.

As vacinas de DNA oferecem uma série de vantagens quando comparadas às vacinas clássicas, em termos econômicos e técnicos. O custo de produção das vacinas gênicas em larga escala é consideravelmente menor ao custo de produção das vacinas compostas de fração subcelular, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. (WHALEN, 1996, ROBINSON, 1997). O controle de qualidade é mais fácil, a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem ser liofilizadas. (WAINE; McMANUS, 1995). Estes fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento. (AZEVEDO et al., 1999, GLENTING; WESSLES, 2005).

Contra-indicações

No caso de indivíduos imunocomprometidos, um grupo com alto risco de desenvolver uma doença, a vacina de DNA seria interessante, pois uma vacina comercial como por exemplo contra a tuberculose (BCG) é contra-indicada. (WHALEN, 1996). Em

crianças e idosos, cujo sistema imunológico se apresenta imaturo ou deficiente, a avaliação da vacina de DNA não apresentou os riscos proporcionados pelas vacinas vivas atenuadas. (SIEGRIST, 1997).

Via de administração

A via intramuscular é a mais utilizada na imunização genética. (OLIVEIRA ET AL 1999). Nesta via o DNA plasmidiano pode ser injetado por intermédio de uma injeção intramuscular (I.M.) diretamente no músculo esquelético do animal, que pode ser nos músculos femural ou músculos quadríceps. É inoculada em cada perna do animal aproximadamente 50 microlitros (ml) do plasmídeo em uma concentração de 1 mg/ml. (AZEVEDO & OLIVEIRA 1998). Em Oliveira et al (1999) é dito que o DNA plasmidiano diluído em solução salina pode ser injetado diretamente para dentro do músculo do animal, ou pode ser aplicado uma injeção de toxina ou um anestésico local, por exemplo, Bupivacaína, para causar necrose e regeneração do músculo injetado, aumentando assim a expressão do antígeno codificado o que resulta em amplificação da resposta imune. Entretanto, em Lima et al (2000) é dito que esses procedimentos não são aceitáveis para serem empregados em humanos devido aos efeitos colaterais.

Vacina para *Toxoplasma gondii*

A imunização de camundongos com os plasmídeos contendo os genes que codificam as proteínas GRA1, GRA7 e ROP2 de *Toxoplasma gondii* induziu imunidade protetora parcial contra desafios letais. Na linhagem de camundongos C3H a razão Ig2a/IgG1 foi maior quando comparada às linhagens BALB/c e C57BL/6 de camundongos. Coincidentemente, a porcentagem de proteção contra desafios letais com cistos de *T. gondii* foi maior em camundongos da linhagem C3H. (VERCAMMEN et al., 2000).

Vacina para *Taenia solium*

A vacina para *Taenia solium* a imunização com DNA plasmidial contendo o gene do antígeno B de *Cisticercus cellulosae* conferiu 92,6% de proteção quando os suínos foram desafiados com ovos de *Taenia solium*. Quatro de cinco animais imunizados com 1000 mg de plasmídeo recombinante e desafiados não apresentaram cistos viáveis de

cisticercose. Entretanto, a imunização com 200 mg de plasmídeo recombinante não foi capaz de impedir a formação de cistos viáveis. (GUO et al., 2007).

Vacina de Anaplasmosose

A vacina de DNA contra a anaplasmosose bovina tem sido investigada com diferentes proteínas de superfície (MSPs). O gene (*m*sp1a) que codifica MSP1a do *Anaplasma marginale* foi inserido no plasmídeo pVCL, vetor de células de mamíferos. A soroconversão, após a inoculação de camundongos e de bovinos com o DNA plasmidial contendo o gene *m*sp1a, foi demonstrada após 21 dias e seis a oito semanas, respectivamente. Em bovinos a produção de imunoglobulina foi restrita ao isotipo IgG1, embora a estimulação de linfócito T auxiliar também foi verificada com a produção de IFN-g. (ARULKANTHAN et al., 1999). A imunização de bovinos utilizando apenas o gene que codifica a MSP1b em plasmídeo de expressão para células de mamíferos, não estimulou satisfatoriamente a produção de anticorpos no período de vacinação, mostrando a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de uma vacina.

A vacina gênica poderá ser aplicada para prevenir qualquer doença infecciosa seja ela virótica, bacteriana e parasitária, sem a menor possibilidade de reversão. Além disso, é uma vacina que poderá ser usada em qualquer país do mundo porque é estável em temperatura ambiente o que facilita a sua distribuição em Estados e países de difícil acesso, os quais são os locais onde há alta incidência de doenças infecciosas. Portanto, esta vacina será uma excelente arma contra doenças infecciosas que há muito tempo esteve presente na humanidade causando surtos e mortes.

Vacina de RNA

Uma variação das vacinas de DNA são as vacinas de RNA. Nesse caso, o RNA mensageiro (mRNA) que codifica proteínas virais de interesse é produzido *in vitro* e incorporado em lipossomos ou em micropartículas. A inoculação dessas partículas ou lipossomos no animal resulta em transporte do mRNA para o interior das células, onde ocorre a tradução e produção da proteína. Esta proteína é, então, apresentada ao sistema imunológico, resultando em estimulação de resposta humoral e celular.

Embora as vantagens e aplicações originalmente vislumbradas, as vacinas de DNA e RNA ainda não encontraram a aplicação inicialmente prevista. Atualmente, apenas uma vacina de DNA encontra-se disponível para uso veterinário. Esta vacina

disponível nos EUA é direcionada para proteger equinos contra o vírus do Nilo Ocidental (WNV), infecção emergente nas Américas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir com o presente estudo que as vacinas foram um ponto crucial para a qualidade de vida de animais e humanos, visto que com elas foi possível cessar o surto de diversas doenças. Referente as vacinas de DNA observou-se que existem diversas vantagens desta sobre as demais existentes. Contudo as vacinas de RNA precisam ser estudadas mais a fundo.

REFERÊNCIAS

- ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.7, p.3481–3487, 1999.
- AZEVEDO, V.; LEVITUS, G.; MIYOSHI, A.; CÂNDIDO, A. L.; GÓES, A. M.; OLIVEIRA, S. C. Main features of DNAbased immunization vectors. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research.**, Ribeirão Preto, v.32, n.2, p.147-153, 1999.
- AZEVEDO V. & OLIVEIRA, S.C. **Vacinas de DNA. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasil**, n. 5, p. 40-43. 1998.
- BARQUET N, DOMINGO P. Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. **An Intern Med.**, v. 127, n. 8, p. 635-642, 1997.
- BAUCHEREAU, J. *ET AL.* 'Dentritic cells and the control of immunity'. **Nature**, v. 293, p. 245-52, 1998.
- CHAHAL JS, KHAN OF, COOPER CL, MCPARTLAN JS, TSOSIE JK, TILLEY LD, ET AL. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 2016.
- CHAMBERS, M. A., VORDERMEIER, H. M., WHELAN, A., COMMANDER, N., TASCAN, R., LOWRIE, D., HEWINSON, R. G. Vaccination of mice and cattle with Plasmid DNA Encoding the *Mycobacterium bovis* Antigen MPB83. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.30, p.S283–S287, 2000.
- DONNELLY J.J. & ULMER, J.B. DNA vaccines for viral diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** USA, n. 32, p. 215-222. 1999.

FYAN, F. F.; WEBSTER, R. G.; FULLER, D. H.; HAYNES, J. R.; SANTORO, J. C.; ROBINSON, H. L. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and genegun inoculations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, n.42, p.11478-11482, 1993.

GLENTING, J., WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v.4, n.26, p.1-5, 2005.

GUO, A.; JIN, Z.; ZHENG, Y.; HAI, G.; YUAN, G.; LI, H.; CAI, X. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. **Vaccine**, Kidlington, v.25, p.170-175, 2007.

HMSO. **Immunisation against Infectious Disease**. London; 1996.

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Paris, v.55, p.751-701, 1999.

LIMA, K.M; SILVA, C.L. & JUNIOR, J.M.R. Microesferas Biodegradáveis. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasil, n. 12, p. 10-13.2000.

LUZ, K.R.; SOUZA, D.C.C.; CICONELLI, R.M. Vacinação em pacientes imunossuprimidos e com doenças reumatológicas auto-Imunes. **Rev Brasil Reumatol.** v. 47, n. 2, p.106-113, 2007.

MIMS C. **Medical Microbiology** . 2nd edition. Mosby. 1998.

MOTA, L.M. ET AL. Vacinação contra febre Amarela em pacientes com diagnósticos de doenças reumáticas em uso de imunossupressores. **Rev Soc Brasil Med Trop.** v. 42, n. 1, p. 23-27, 2009.

MOREL, P. A.; FALKNER, D.; PLOWEY, J.; LARREGINA, A. T.; FALO JR., L. D. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. **Vaccine**, Kidlington, v.22, p.447-456, 2004.

NAZ RK. Vaccine for contraception targeting sperm. **Immunol Ver.** v.171, p.193-202, 1999;

NETO, VICENTE AMATO; BALDY LUÍS DA SILVEIRA; SILVA, LUIZ JACINTHO DA SILVA. **Imunizações**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 2011.

OLIVEIRA, S.C; ROSINHA, G.M. S; BRITO, C.F.A; FONSECA, C.T; AFONSO, R.R; COSTA, M.C.M.S; GÓES, A.M; RECH, E.L & AZEVEDO, V. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. **Journal of medical and Biological Research**. Brasil n. 32, p. 207-214. 1999.

OSHOPI, G. L.; ELANKUMARAN, S.; HECKERT, R. A. DNA vaccination in the avian. **Veterinary Immunology and Immuno-pathology**, v. 89, p. 1-12, 2002.

PLOTKIN AS, ORENSTEIN WA. **Vaccines**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1999.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**, v. 11, p. S5-S11, 2005.

RAIN CZUK, A.; SMOOKER, P. M.; KEDZIERSKI, L.; BLACK, C. G.; COPPEL, R. L.; SPITHILL, T. W. The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi* adami challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol. **Vaccine**, Kidlington, v.21, p.3030-3042, 2003.

RAHMAN, M. et al. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 202-209, 2008.

ROBINSON, H. L. Nucleic acid vaccines: an overview. **Vaccine**, Kidlington, v.15, n.8, p.785-787, 1997.

ROITT, I; BROSTOFF, J. & MAL, D. **Imunologia**. 4. ed, Editora Manole, São Paulo, SP, 1997, cap. 19, p. 19.1-19.10.

SAADE, F.; PETROVSKY, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, p. 189–209, 2012

SIEGRIST, C. A. Potencial advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. **Vaccine**, Kidlington, v.15, n.8, p.798-800, 1997.

SILVA, C.L. Vacinas Gênicas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasil, n. 3, p. 323-34. 1997.

SILVA, L.J.; FARHAT, C.K; CARVALHO, E.S; WECKX, L.Y; CARVALHO, L.H.F.R. & SUCCI, R.C.M. **Imunizações fundamentos e prática**. 4. ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2000, cap. 44, p 603-611.

SIMMERMAN, M. Advances in DNA Vaccines. **Nurse Practitioner**. USA, v. 27, p. 53-59. 2002.

SRIVASTAVA, I.K.; LIU, M.A. Gene Vaccines. **Annals of Internal Medicine**; USA, v.138, p. 550-560. 2003.

ULMER, J. B.; DONNELLY, J. J.; PARKER, S. E.; PODES, G. H.; FELGNER, P. L.; DWARKI, V. J.; GROMKOWSKI, S. H.; RANDALL DECK, R.; DeWITT, C. M.; FRIEDMAN, A.; HAWE, L.A.; LEANDER, K. R.; MARTINEZ, D.; PERRY, H. C.; SHIVER, J. W.; MONTGOMERY, D. L.; LIU, M. A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, New York, v.259, p.1745-1749, 1993.

ULMER, J. B.; WAHREN, B.; LIU, M. A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **Trends in Molecular Medicine**, London, v.12, n.5, p.216-222, 2006.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K.; DE BRAEKELEER, J.; DIET, R.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; VERSHUEREN, H. DNA vaccination with genes encoding toxoplasma gondii antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.1, p.38-45, 2000.

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

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

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, New York, v.247, p.1465-1468, 1990.