

Desenvolvimento e aplicações de vacinas gênicas no tratamento e prevenção de doenças

Development and applications gene vaccines for treatment and diseases prevention

Gustavo Reinhardt

Biomedicina Universidade Positivo

gustavo.up98@gmail.com

Haniel Siqueira Mortagua Walfior

Biomedicina Universidade Positivo

hanicap16@gmail.com

José Henrique Bispo Trigo

Biomedicina Universidade Positivo

jose_bht@hotmail.com

Joao Luiz Coelho Ribas

Universidade Positivo

Centro Universitário Internacional Uninter

joao.ribas@up.edu.br

Resumo

As vacinas gênicas, bem como seus métodos de armazenamento e distribuição, vêm sendo desenvolvidas, exploradas e aprimoradas desde os anos 90. A peculiaridade que as diferem das demais vacinas está relacionada ao uso da tecnologia do DNA recombinante para sua produção. A recombinação do DNA de um vetor, normalmente um plasmídeo, com um gene específico para a posterior expressão de um antígeno é a essência do método. Por não fazerem uso de microrganismos, mortos ou atenuados, a segurança em sua aplicação é maior, assim como a estabilidade, armazenamento e entrega. Estudos recentes relacionados ao uso dessas vacinas no tratamento e prevenção de doenças demonstram resultados estimuladores com eficácia superior às demais vacinas. O objetivo deste artigo está concentrado nos métodos de obtenção das vacinas gênicas, sua relação com o sistema imune e como, estas, estão sendo utilizadas no tratamento e prevenção de doenças.

Palavras-chave: Vacinas gênicas; Vacinas de DNA; DNA recombinante; Plasmídeo.

Abstract

Gene vaccines, as well as its methods of storage and delivery, have been developed, explored and enl since the early 1990s. A peculiarity that differentiate them from others vaccines is related with the use of the recombinant DNA technology for its production. The DNA recombination of a vector, normally a plasmid, with a specific gene to successive expression into an antigen of interest is the essence of the method. Since the DNA vaccines don't use microorganisms, dead or attenuated, the security in its application it's bigger, as well as its stability, storage and delivery. Recent studies, related with the use of these vaccines in the treatment and prevention of diseases, shown exciting results, with superior efficacy compared with traditional vaccines. The appointment with this article is concentrated in the methods of obtaining gene vaccines, its relation with the immune system and how they are being used in the treatment and prevention of diseases.

Keywords: Gene vaccines; DNA vaccines; Recombinant DNA; Plasmid.

Introdução

As vacinas foram criadas a partir do que se era chamado de variolação. Era uma técnica em que se retirava o constituinte de uma pústula (ferida), que é característica das pessoas que contraem o vírus da varíola, e inoculavam por via subcutânea em indivíduos que não possuíam a doença. Essa técnica foi criada, provavelmente antes do século XVIII em regiões como China, África e Índia, porque era de conhecimento comum que os sobreviventes da varíola se tornavam imunes a doença. Apenas entre 1796 e 1798 o termo vacinação começou a ser utilizado (RIEDEL, 2005).

O britânico Edward Jenner publicou em 1798 um dos trabalhos mais importantes para a medicina, sendo considerado como o fundamento da imunologia, que consistia em um experimento feito em 1796. Esse experimento foi realizado a partir de lesões causadas por um subtipo da varíola, a varíola bovina, infectando uma jovem chamada Sarah Nelms. Jenner inoculou o conteúdo das lesões de Nelms em um menino de 8 anos chamado James Phipps que, mesmo tendo tido efeitos característicos da doença, porém brandos, em 1796, quando entrou em contato novamente com o vírus, nenhum sintoma ou doença se desenvolveu (RIEDEL, 2005).

A partir da ideologia proposta no trabalho de Jenner, vacinas utilizando microorganismos vêm sendo amplamente utilizadas e são capazes de diminuir drasticamente os casos de infecção e até erradicar doenças. Difteria e Poliomielite são exemplos de doenças bacterianas e virais, respectivamente, que foram totalmente erradicadas devido ao uso de vacinas pela população (ABBAS, 2013).

Outra maneira de combater doenças, mas nesse caso, somente as causadas por bactérias, é o uso de antibióticos. Esses fármacos podem ser substâncias naturais ou sintéticas que exercem sua ação em bactérias inibindo seu crescimento ou matando-os, sendo denominados, respectivamente, bacteriostáticos e bactericidas. Porém, devido ao uso desenfreado e incorreto de antibióticos, esses micro-organismos estão se tornando super-resistentes. Esse uso equivocado pode ocorrer devido à prescrição incorreta de um antibiótico por parte do médico, tanto com um tempo prescrito menor do que o necessário para eliminar todas as bactérias causadoras da infecção, como um equívoco para tratar um sintoma similar à uma infecção, pacientes que se automedicam podem não ter o conhecimento que antibióticos são utilizados apenas para combater as bactérias (RAMALHINHO, 2012).

A super-resistência ocorre devido a causas características naturais das bactérias, como o alto índice de mutação e promiscuidade, quando há troca de material genético, o qual promove resistência (FAIR, 2014; DE OLIVEIRA, 2007).

O plasmídeo é uma dupla fita de DNA extracromossômico facultativa entre as bactérias, o qual pode carregar genes que conferem resistência (plasmídeo R) ao servir de código para síntese de enzimas que inativam antibióticos e metais pesados. Nesse material genético é possível introduzir um gene exógeno que codificará uma proteína de interesse, como é a técnica para produção de insulina, chamada de DNA recombinante, também utilizado para a produção das vacinas de DNA. Uma técnica atrelada ao DNA recombinante é a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual é utilizada para amplificação de genes e possível sequenciamento, essencial para inúmeras técnicas moleculares, diagnósticos de infecções e análises forenses (HOLLAND 1991).

As vacinas gênicas possuem a finalidade de produzir um antígeno específico, a partir de um gene contido em um vetor que está dentro de um hospedeiro, com o intuito de estimular uma resposta imune adaptativa, tanto celular como humoral. Por isso, essas vacinas vêm surgindo como métodos de tratamento para os mais variados tipos de doenças, como doenças Neurodegenerativas, Hepatite B, Cólera, Fibrose Cística, vários tipos de câncer, Diabetes Autoimune, Tuberculose, Dengue, entre outros, além de ser um mecanismo alternativo para imunização contra bactérias super-resistentes, as quais causam um problema público por incremento de gastos para tratamento hospitalar de

pacientes infectados, chegando a custar cerca de oito bilhões de dólares por ano aos Estados Unidos. O alto custo para produção de antibióticos e vacinas não-gênicas torna as vacinas de DNA favoráveis à pesquisa e aprimoramento (RODRIGUEZ-NORIEGA, 2014).

O objetivo desta revisão foi elucidar o mecanismo de produção de vacinas gênicas e sua importância no desenvolvimento de estudos para combater, não somente bactérias resistentes, mas qualquer doença causada por bactérias, vírus, fungos, e, também, doenças como as Neurodegenerativas, Câncer, Fibrose Cística e várias outras.

METODOLOGIA

Esse estudo constitui-se de uma revisão da literatura especializada, realizada entre maio de 2017 e junho de 2017, efetuando pesquisas em três bases de dados bibliográficas, a PubMed, ResearchGate e Scholar Google. Nessas plataformas foram buscados os descritores: “DNA vaccine”; “gene vaccines”; “recombinant DNA technology”; “rDNA”; “antibiotic resistance”; “vaccine history”. Para os artigos procurados na plataforma PubMed, os tipos de artigos foram focalizados em revisões, completos, gratuitos e publicados em um período de no máximo 5 anos, com estudos realizados em animais e/ou humanos, podendo estar em inglês, espanhol e português. Nas plataformas ResearchGate e Scholar Google foram utilizados artigos em inglês.

VACINAS GÊNICAS: APLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

As vacinas gênicas, também chamadas de vacinas de DNA, consistem no uso de determinados genes de interesse para a síntese de antígenos específicos. A definição de antígeno, segundo Abbas (2012), é destinada aos grupos de substâncias biológicas isoladas ou complexadas em células que, quando introduzidas em um organismo hospedeiro, são capazes de induzir uma resposta imune. Esses antígenos, no geral, são proteínas e polissacarídeos. Por exemplo, bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, possuem substâncias químicas complexadas em sua estrutura, como o polissacarídeo O presente na porção externa da LPS (camada de lipopolissacarídeos), que atuam como antígenos. Devido seu papel antigênico, o polissacarídeo-O também é chamado de antígeno-O

(KALYNYCH, 2012; WRIGHT, 1990). No entanto, como a expressão de genes é capaz, apenas, de dar origem a polipeptídeos e proteínas, o foco de se utilizar o DNA recombinante é produzir antígenos com natureza proteica.

Os anticorpos, por sua vez, são proteínas que atuam na defesa contra antígenos. São conhecidos como imunoglobulinas (Ig) e são divididos em 5 grupos: IgA; IgD; IgE; IgG; IgM. Todos possuem uma cadeia pesada, uma cadeia leve e regiões como Fab, que determinam a interação anticorpo-antígeno, e FC, relacionada à função do anticorpo. Os anticorpos não reconhecem antígenos inteiros, mas, sim, pequenas porções de sua estrutura que possuem afinidade à região Fab do anticorpo. Essas pequenas porções de antígenos que interagem com anticorpos e estão relacionadas com a antigenicidade de um antígeno são chamadas de epítomos ou determinantes antigênicos (ABBAS, 2012).

Os anticorpos são produzidos por células denominadas de linfócitos B. Quando o organismo entra em contato com algum agente agressor, como uma bactéria, uma resposta imune é desencadeada. Logo após o contato com o antígeno, células do sistema imune inato, como células NK, macrófagos, células dendríticas e leucócitos, atuam defendendo o organismo primariamente. Células apresentadoras de antígenos (APCs) atuam capturando o antígeno da circulação sistêmica e apresentando-os às células do sistema imune adaptativo nos órgãos linfóides periféricos por intermédio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) (ABBAS, 2013; NEEFJES, 2011).

Cerca de 12 horas após o primeiro contato, o sistema imune adaptativo começa a agir. O linfócito B maduro, quando ativado por um antígeno, diferencia-se em plasmócito e passa a produzir anticorpos específicos àquele determinado antígeno (ABBAS, 2012).

As figuras 1 e 2 demonstram a interação epítomo-anticorpo e permite compreender visualmente como se dá o mecanismo de reconhecimento de um anticorpo a um antígeno.

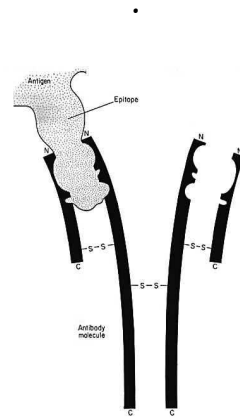


Figura 1 – Mecanismo de interação antígeno-anticorpo

Fonte: SIKORA e SMEDLEY (1984)

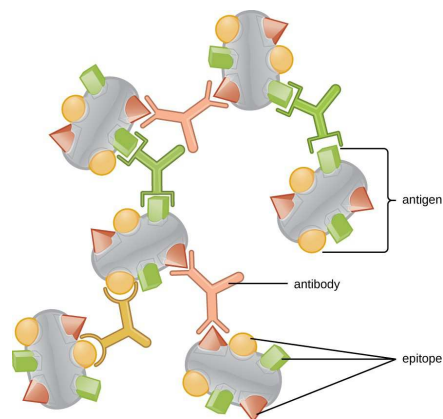


Figura 2 – Interação de anticorpos policlonais com antígenos diversos.

Fonte: OpenSTAX MICROBIOLOGY (2017)

As vacinas não-gênicas, normalmente, estão relacionadas com a inoculação de vírus e microrganismos, como bactérias mortas ou atenuadas que, nestas situações, dificilmente causarão problemas à saúde, a um organismo hospedeiro. Os microrganismos atenuados

induzem a produção de anticorpos àquele antígeno e, a partir desse momento, fazem com que o hospedeiro permaneça imunizado para que, em um segundo contato com o patógeno, ele consiga se defender mais intensamente e rapidamente (FERRARO, 2011).

Contudo, o tempo e o orçamento gasto para o processamento de um antígeno, esse sendo uma bactéria por exemplo, é grande quando comparado ao das vacinas gênicas. Isso ocorre devido as vacinas gênicas estarem relacionadas à inoculação, apenas da proteína antigênica. Não há a necessidade de se seguir os protocolos de atenuação, armazenamento e entrega de microrganismos, que são os responsáveis por uma grande parte do tempo e orçamento gastos. Além disso, vacinas tradicionais (não-gênicas), no quesito de duração da proteção (imunização) e estímulo celular e humoral da imunidade, vêm sendo ultrapassadas pelas vacinas gênicas devido a eficácia, destas, em desenvolverem um melhor estímulo imune (FERRARO, 2011).

Pode-se dizer que as vantagens no uso de vacinas de DNA estão, basicamente, relacionadas com: o custo e o tempo de produção; estabilidade molecular da vacina (vacinas de DNA são mais estáveis, inclusive ao calor); segurança; manipulação; fácil obtenção; maior indução de respostas imunes (celular e humoral); sem riscos de infecções; eficácia; e especificidade do método (FERRERA, 2007; KHAN, 2013).

A figura 3 traz uma tabela, presente em um estudo recente (2013) conduzido por Khan (2013), com as principais vantagens no uso de vacinas de DNA no âmbito laboratorial.

Advantages of DNA vaccines	References
Inexpensive	27
Long-term persistence of immunogenicity	19
Subunit vaccination with no risk for infection	28
Antigen presentation by both MHC class I and class II molecules	28
Ability to polarize T-cell help toward type 1 or type 2	28
Ease of development and production	27,28
Immune response focused only on antigen of interest	23
Stability of vaccine for storage and shipping	25
In vivo expression ensures that the protein resembles the normal eukaryotic structure more closely, with accompanying post-translational modifications	19
DNA vaccines are safer, more stable, and easy to handle	29
DNA vaccines induce protective humoral and cellular immune responses	30
DNA vaccines are heat stable	27
A mixture of plasmids could be used to form a broad spectrum vaccine	25

Figura 3 – Vantagens das vacinas de DNA.

Fonte: KHAN (2013).

Devido ao fato de surgirem como alternativa aos antibióticos, as vacinas bacterianas, gênicas ou não-gênicas, possuem um importante papel na manutenção no uso exagerado de antibióticos que, ao passar dos anos, vem fazendo com que mais casos de resistências bacterianas sejam relatados (FAIR, 2014; DE OLIVEIRA, 2013; RAMALHINHO, 2012, GOMESI, 2007; DE OLIVEIRA, 2007).

O plasmídeo (pequeno DNA circular extra cromossômico) é uma estrutura facultativa de bactérias e normalmente está relacionado a mecanismos de resistência bacteriana. Apesar de ser um DNA “acessório”, esse é expresso igualmente ao DNA principal bacteriano e pode vir a conter um gene de resistência. Por exemplo, esse gene de resistência, quando expresso, pode configurar a síntese de uma enzima que degrada um antibiótico, como é o caso da beta-lactamase. Bactérias que produzem essa enzima possuem resistência à penicilina, pois a enzima beta-lactamase quebra as ligações do anel beta lactâmico da penicilina, degradando sua estrutura e fazendo com que ela não surta seu efeito microbicida (READING, 1977; TORTORA, 2012).

O uso excessivo de antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas hospitalares vem aumentando os números de casos de bactérias super-resistentes, sendo possível a partir da teoria de Darwin, compreender um pouco mais sobre isso. Segundo

Darwin, os organismos mais bem adaptados ao meio ambiente em que estão inseridos serão selecionados para sobreviverem. Desse modo, o uso inapropriado e excessivo de antibióticos fez com que, ao passar dos anos, os pequenos grupos de bactérias que possuíam o plasmídeo com o gene de resistência à penicilina, por exemplo, fossem selecionados para sobreviverem, enquanto os grupos que não possuíam o mesmo mecanismo fossem selecionados para morrerem. Assim, bactérias antes frágeis ao tratamento com antibióticos se tornaram bactérias resistentes a eles (DE OLIVEIRA, 2007; GOMES, 2007; RAMALHINHO, 2012; DE OLIVEIRA, 2013; FAIR, 2014).

O principal responsável pelo desenvolvimento de resistências bacterianas (plasmídeo), também pode ser utilizado a nosso favor. O DNA recombinante, tão rotineiro em pesquisas atuais, é obtido com a “edição” de plasmídeos. Essa edição é feita com a deleção de uma determinada sequência do plasmídeo e a inserção de um gene de interesse (gene exógeno) a ser clonado, como um gene que codifica uma proteína antigênica, insulina e outras proteínas, como as de interesse econômico (utilizadas em alimentos transgênicos, por exemplo). Primeiramente, o gene de interesse deve ser identificado e sequenciado. Depois, são utilizadas enzimas de restrição (figura 2) que irão isolar o gene de interesse do restante do material genético. As mesmas enzimas de restrição são utilizadas para deletar uma sequência específica do plasmídeo, de modo que seja possível a ligação do gene exógeno a ele. Essa ligação é feita pelas enzimas DNA-ligasas. O complexo gene exógeno mais plasmídeo é tido como DNA recombinante. A figura 4 mostra a ação de uma enzima de restrição específica.

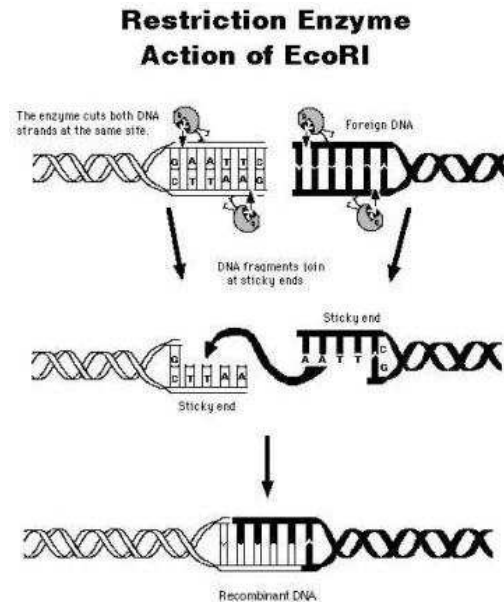


Figura 4 – Ação de uma enzima de restrição específica.

Fonte: CSC (2017)

Juntamente com o gene de interesse e de estímulo de expressão em células eucarióticas (para que haja uma adequada expressão e imunização), genes de resistência a antibióticos específicos (genes de seleção) são adicionados ao plasmídeo. Isso se faz necessário, pois, como o plasmídeo recombinante será inoculado no interior de bactérias – comumente a *Escherichia coli* – para sucessiva divisão, num meio de cultivo adequado, algumas poderão não o possuir após todo o processo (WILLIAMS, 2009).

Para selecionar somente as que possuem o plasmídeo recombinante, as colônias são submetidas à exposição de antibióticos específicos correspondente ao gene de seleção. Deste modo, somente as bactérias que possuírem o plasmídeo editado, contendo os genes de seleção e interesse, irão sobreviver. Após esse processo, as bactérias são submetidas ao processo de lise celular para a liberação do plasmídeo. A solução contendo o plasmídeo e os restos celulares bacterianos é purificada. A última etapa é inocular o DNA recombinante em um hospedeiro. Como se trata de vacinas gênicas, a inoculação será em células eucariontes, por exemplo as da pele ou músculo de um organismo que deseja-se imunizar. Já nas células hospedeiras, o plasmídeo irá ser expresso fazendo com que os antígenos sejam sintetizados (WILLIAMS, 2009).

A figura 5 esquematiza, resumidamente, as etapas da síntese do plasmídeo recombinante discutidas acima. A figura 6 demonstra o mecanismo de obtenção do DNA recombinante, enquanto a figura 7 detalha molecularmente a estrutura de um DNA recombinante contendo genes de antígenos específicos, seleção e expressão.

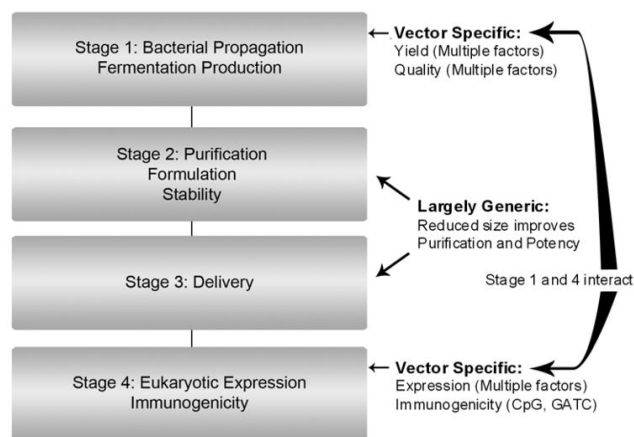


Figura 5 – Estágios da produção de uma vacina gênica a partir do ensaio in vitro com bactérias.

Fonte: WILLIAMS; ARNES; HODGSON (2009).

Plasmid Insertion

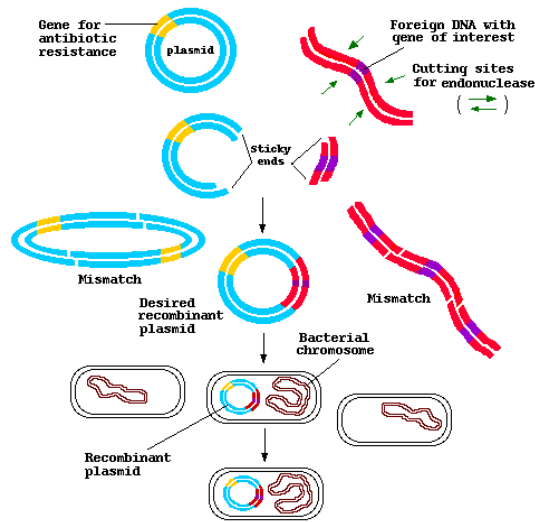


Figura 6 – Mecanismo de obtenção do DNA recombinante.

Fonte: [whaleandwasp](#) (2017)

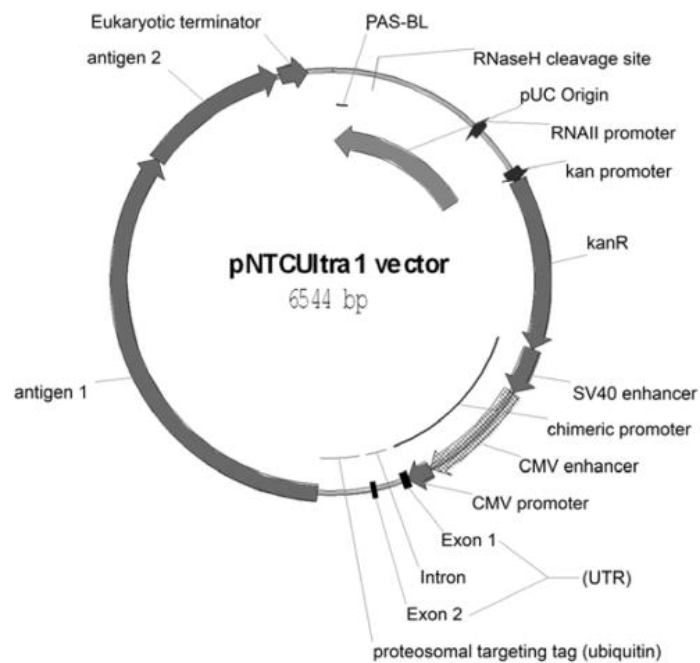


Figura 7 – Detalhe molecular de um DNA recombinante específico.

Fonte: WILLIAMS; ARNES; HODGSON (2009).

No uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para obtenção de vacinas gênicas, dois requisitos são necessários: conhecer a sequência “alvo” que se deseja amplificar e “desenhar” os primers específicos para iniciar a transcrição do gene de interesse.

O gene de interesse, depois de ser sequenciado, antes de ser acoplado ao plasmídeo, deve passar pela PCR. O procedimento de PCR, também conhecido como reação em cadeia da polimerase, é imprescindível no âmbito de estudos relacionados com DNA, pois permite que, com pouca quantidade de amostra, se obtenha grandes quantidades de material genético em poucas horas. Trata-se de um método laboratorial em que a amostra de DNA extraída de uma célula, como em nosso caso o gene de interesse, é submetida à amplificação, com enzimas polimerases extraídas da bactéria *Thermus aquaticus*. As polimerases da *T. aquaticus* transmitem uma fiel síntese de DNA e, por esse motivo, são utilizadas com frequência em procedimentos de PCR (ECKERT, 1990; HOLLAND, 1991).

A partir dos mecanismos básicos descritos acima, é possível compreender o porquê de ser haver vantagens, como as discutidas anteriormente, no uso de vacinas gênicas, pois, a produção *in vitro* do gene de interesse pode ser feita em ampla escala, de modo barato e com um curto período de tempo (FERRERA 2007; KHAN, 2013).

Aos poucos, vacinas gênicas vêm substituindo as vacinas tradicionais devido, principalmente, às questões discutidas anteriormente. Sabemos que a principal aplicação de vacinas é para o tratamento e prevenção de infecções por microrganismos. No entanto, outros meios mais recentes estão sendo explorados, como tratamentos de tumores malignos e benignos, infecções crônicas (HIV, HPV, HBV, etc.), doenças autoimunes, neuropatias degenerativas, dentre outros (WU, 2017; GONG, 2017; VILARREAL, 2013). A seguir, serão apresentados alguns trabalhos publicados, no qual foram feitos testes com vacinas gênicas para o tratamento ou prevenção de doenças.

O tratamento de doenças causadas por microrganismos com vacinas de DNA está, principalmente, relacionado ao combate deles. Desse modo, para microrganismos já afetados pelas vacinas tradicionais, a eficácia das vacinas de DNA tende a ser superior. Em um estudo recente (2015) realizado com ratos, Sun, Li, et al., demonstraram que o uso da

vacina gênica para a expressão do antígeno 85A (presente na *Mycobacterium tuberculosis*), associado a um adjuvante, induz uma resposta imune mais intensa, em ratos, com a atividade de células NK e de linfócitos B (produzem IgA e IgG em maiores quantidades) aumentada (figura 5). Essa resposta mais forte, por si só, nos indica que a capacidade dessa vacina em combater a *M. tuberculosis* apresenta-se superior quando comparada às demais vacinas.

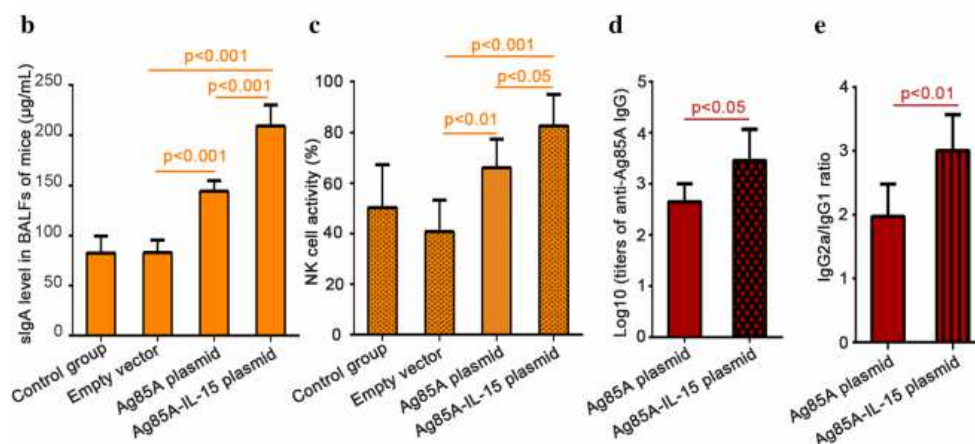


Figura 8 – Resposta imune com a aplicação do plasmídeo contendo o gene que codifica o antígeno A65 (Ag85A) e do plasmídeo contendo o gene Ag85A mais o gene do adjuvante (IL-15).

Fonte: SUN et al. (2017).

Como dito acima, outros tipos de doenças, além das causadas por microrganismos, estão sendo alvos das vacinas gênicas, e essas tentativas são, um tanto quanto, animadoras. Uma delas é alvo de um estudo publicado recentemente (2017) por Wu, Chao-Chi, et al., e está relacionada com o tratamento de cânceres no geral, a partir da fusão de duas proteínas, a BAFF (fator de ativação de células B) e a E7 (proteína característica do vírus do papiloma humano). Os genes, tanto da BAFF como da E7 encontram-se na vacina de DNA e, durante a expressão, o produto final é conjugado formando um complexo BAFF-E7. Foi observado por Wu, Chao-Chi e colegas que, em ratos, esse complexo possui uma eficácia elevada na ação antitumoral, diminuindo o volume de células tumorais (figura 6).

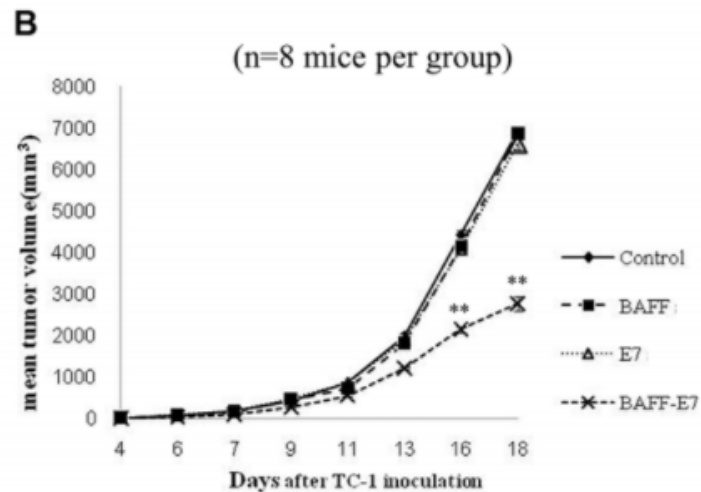


Figura 9 – Atividade antitumoral do complexo BAFF-E7 obtido com a vacina gênica.

Fonte: WUO-CHIH et al (2017).

Gong, Yuan-Feng, et al., conduziram outro estudo publicado (2017) relacionado no tratamento de tumores. Neste caso, o alvo eram células neoplásicas do câncer pancreático. Foram sequenciados, e recombinados a um plasmídeo, genes que frequentes em casos de cânceres no geral e pancreáticos. Um dos genes codifica a MUC-1 que é uma proteína expressa de forma anormal em células cancerígenas. O outro codifica uma sequência numérica variável de repetições de 20 aminoácidos, o VNTR, frequente em câncer pancreático. A expressão dos genes da vacina, em ratos, fez com que os níveis de células cancerígenas diminuíssem significativamente (figura 7), marcando um resultado positivo para a terapia com a vacina MUC1-VNTR_n.

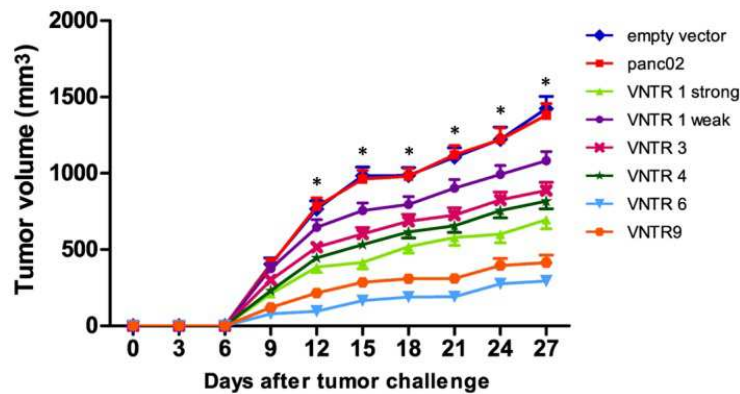


Figura 10 – Atividade antitumoral da vacina gênica MUC1-VNTR_n.

Fonte: GONG, Yuan-Feng et al. (2017).

CONCLUSÃO

Tendo em vista o que foi discutido ao decorrer deste artigo, é notável o grande avanço que a comunidade científica vem tomando ao decorrer dos anos. As vacinas gênicas, quando comparadas às tradicionais, demonstram vantagens que, tanto no âmbito laboratorial, relacionadas à velocidade, estabilidade, custo e benefício de obtenção, como no da saúde, relacionadas com a segurança, precisão e eficácia do método, fazem com que sejam boas candidatas a se tornarem as principais protagonistas no combate e prevenção dos diversos tipos de doenças que assolam a sociedade.

No entanto, devido ao fato de somente envolverem produtos finais da expressão gênica, comumente as proteínas, a aplicação de vacinas gênicas pode tornar-se limitada. Além disso, visto que, para sua produção, são necessários conhecimentos específicos como o mapeamento genético com o sequenciamento de genes de interesse, “desenho” de um primer complementar, enzimas de restrição específicas e, em alguns casos, associação com adjuvantes, o desenvolvimento e a aplicação de vacinas gênicas, além de ser promissor, requer esforços e avanços científicos mais aprofundados na área.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- CSH. Cold Spring Harbor Laboratory. Restriction enzyme action of EcoRI. Disponível em: < <https://www.dnalc.org/resources/animations/restriction.html> > Acesso em: 26 jun.2017.
- DE OLIVEIRA, A. L. Resistência bacteriana a antibióticos: Uma análise da conduta hospitalar. **Revista Cesumar–Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 11, n. 1, p. 59-69, 2007.
- DE OLIVEIRA, K. R.; MUNARETTO, P. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 18, p. 43-51, 2013.
- COELHO, S.M.O. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene mecA em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência rural**, v. 37, n. 1, 2007.
- ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 13, p. 3739-3744, 1990.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. 25, 2014.
- FERRARO, B. et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 3, p. 296-302, 2011.
- FERRERA, F. et al. Gene vaccination for the induction of immune tolerance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, n. 1, p. 99-111, 2007.
- GONG, Y. F. et al. Optimized construction of MUC1-VNTRn DNA vaccine and its anti-pancreatic cancer efficacy. **Oncology Letters**, v. 13, n. 4, p. 2198-2206, 1899.
- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.
- KALYNYCH, S. et al. Structural characterization of closely related O-antigen lipopolysaccharide (LPS) chain length regulators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15696-15705, 2012.
- KHAN, K. H. DNA vaccines: roles against diseases. **Germs**, v. 3, n. 1, p. 26, 2013.
- NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823-836, 2011.

OpenSTAX MICROBIOLOGY. Overview of Specific Adaptive Immunity. Antigens. Disponível em: < <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/overview-of-specific-adaptive-immunity/> > Acesso em: 26 jun. 2017.

RAMALHINHO, I. al. A Evolução do Consumo de Antibióticos em Ambulatório em Portugal Continental 2000-2009. **Acta Médica Portuguesa**, v. 25, n. 1, 2012.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 852-857, 1977.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Proceedings**, v. 18, n. 1, p. 21-25, 2005.

RODRIGUEZ-NORIEGA, E. et al. Evolution of bacterial resistance to antibiotics in México, 1973-2013. **Biomédica**, v. 34, supl. 1, p. 181-190, 2014.

SIKORA, K.; SMEDLEY, H.M. Monoclonal antibodies. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1984.

SUN, L. et al. Novel adjuvant for immunization against tuberculosis: DNA vaccine expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and interleukin-15 fusion product elicits strong immune responses in mice. **Biotechnology Letters**, p. 1-8, 2017.

VILLARREAL, D. O. et al. Synthetic DNA vaccine strategies against persistent viral infections. **Expert review of vaccines**, v. 12, n. 5, p. 537-554, 2013.

WILLIAMS, J. A.; CARNES, A. E.; HODGSON, C. P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 4, p. 353-370, 2009.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431-1434, 1999.

WU, C. C. et al. Enhanced anti-tumor therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusing the E7 gene to BAFF in treating human papillomavirus-associated cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33024-33036, 2017.