

Estudo de caso: Como desenvolver uma vacina de DNA contra a dengue?



**Mariane Aparecida Franco de Godoy¹,
Aline Marengoni Almeida²,
Karla Gabriela da Silva²,
Ana Luiza de Brito Portela Castro³,
Luciana Andreia Borin-Carvalho³**

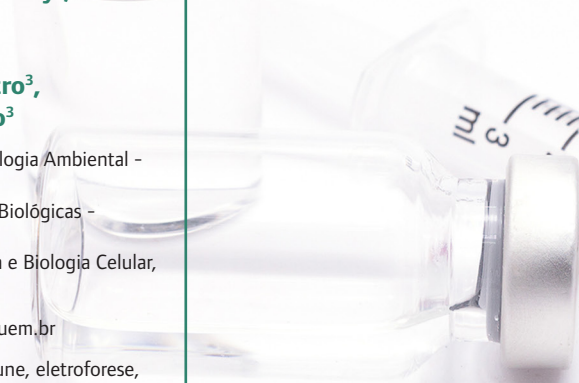
¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental -
Universidade Estadual de Maringá, PR

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas -
Universidade Estadual de Maringá, PR

³ Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular,
Universidade Estadual de Maringá, PR

Autor para correspondência - labcarvalho@uem.br

Palavras-chave: biotecnologia, sistema imune, eletroforese,
vacina de DNA, *Aedes aegypti*, material didático



Como o sistema imunológico responde após a injeção de uma vacina,? O que faz uma vacina ser considerada eficaz? Como a biotecnologia pode ser empregada neste campo? – Este material didático aborda estas e outras questões por meio do emprego de metodologias de biologia molecular a fim de que alunos do ensino médio ou superior conheçam as etapas e os dados que devem ser considerados quando se busca a produção de uma vacina de sucesso. O estudo de caso usa a simulação de um método de biologia molecular, a eletroforese, para ajudar a compreender como uma vacina contra a dengue é desenvolvida e depois testada para garantir sua eficácia e segurança.



Na atividade proposta, os estudantes realizam uma **eletroforese** em gel para simular quais dos **genes estruturais** (C,M,E) do vírus da dengue estão presentes em quatro vacinas hipotéticas (V1, V2, V3 e V4). Em seguida, os estudantes usam os dados obtidos na atividade de eletroforese e os resultados sobre a produção de anticorpos e de células T citotóxicas em modelos animais para determinar qual seria a vacina escolhida para um ensaio clínico em humanos.

A atividade pode ser desenvolvida com os estudantes divididos em grupos. O item **Guia do professor** contém orientações para o professor preparar e desenvolver a atividade e o **Guia do Estudante**, juntamente com cópia dos itens **Material de apoio**, **Vacina da dengue: um estudo de caso** e **Estudo *in vivo*** que orienta a atuação dos diferentes grupos durante a aula.

Utilizando o tema dengue como problemática, a organização deste material baseou-se no material de apoio intitulado *AIDS Vaccine Case Study* disponibilizado pela *University of Rochester Medical Center* (<https://www.urmc.rochester.edu/life-sciences-learning-center/resources-lessons/lessons/aids-vaccine-case-study.aspx>).

GUIA DO PROFESSOR

Vacina da dengue: um estudo de caso - Neste estudo de caso, os alunos receberão informações sobre a resposta do sistema imunológico quando expostos a partes do genoma, correspondentes aos genes estruturais do vírus da dengue.

Objetivos de aprendizado: Realizar uma eletroforese em gel utilizando corantes para

simular a separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e verificar quais deles estão presentes em quatro vacinas hipotéticas contra o vírus da dengue;

- ✦ Utilizar informações fornecidas sobre a resposta do sistema imune a patógenos, dados de dois estudos *in vivo* e os resultados obtidos na atividade de eletroforese em gel para identificar quais vacinas seriam mais adequadas para um ensaio clínico em humanos.

Materiais:

- ✦ 4 tubos de ensaio etiquetados, respectivamente, como Vacina V1, Vacina V2, Vacina V3, Vacina V4 (preparadas conforme descrição no anexo 1);
- ✦ 1 micropipeta capaz de dispensar 7µL;
- ✦ 4 microponteiras descartáveis;
- ✦ Gel de agarose a 1,5% conforme descrição no anexo 1
- ✦ **Tampão** de eletroforese TAE 1X (ver receita no anexo 1);
- ✦ Uma cuba para eletroforese (preferencialmente pequena, com dimensões aproximadas de 15x15 cm);
- ✦ Acesso a uma fonte de energia;
- ✦ Copiar e preparar para distribuição os itens “Guia do estudante”, “Material de Apoio”, “Vacina da dengue: um estudo de caso”.

Sugere-se trabalhar com esta atividade em grupos de 2 a 4 alunos. Uma cópia dos seguintes itens: “Guia do estudante”, “Material de Apoio”, “Estudo de caso” e “Estudo *in vivo*” devem ser entregues a cada grupo.

Eletroforese: técnica usada para separar fragmentos de DNA de acordo com o tamanho.

Genes estruturais: genes que codificam para proteínas envolvidas na formação do nucleocapsídeo e do envelope viral.

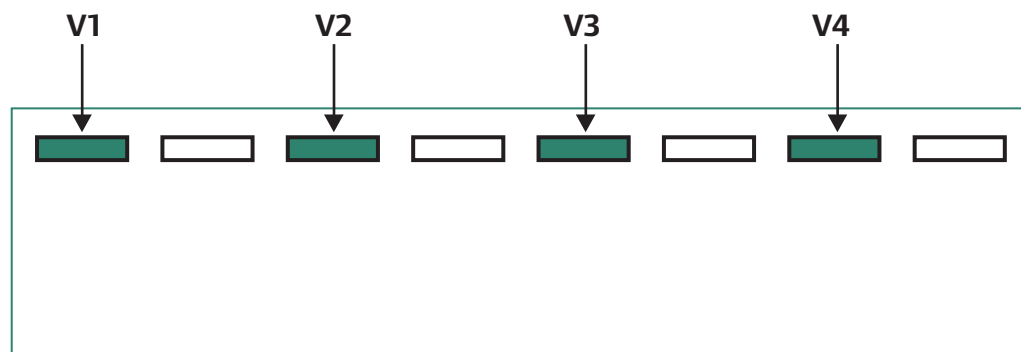
Tampão: solução usada em eletroforese a fim de estabilizar o pH do meio e que permite o fluxo da corrente elétrica. O Tris-Acetato-EDTA (TAE) é uma solução tampão comumente usada na eletroforese de DNA em gel de agarose.



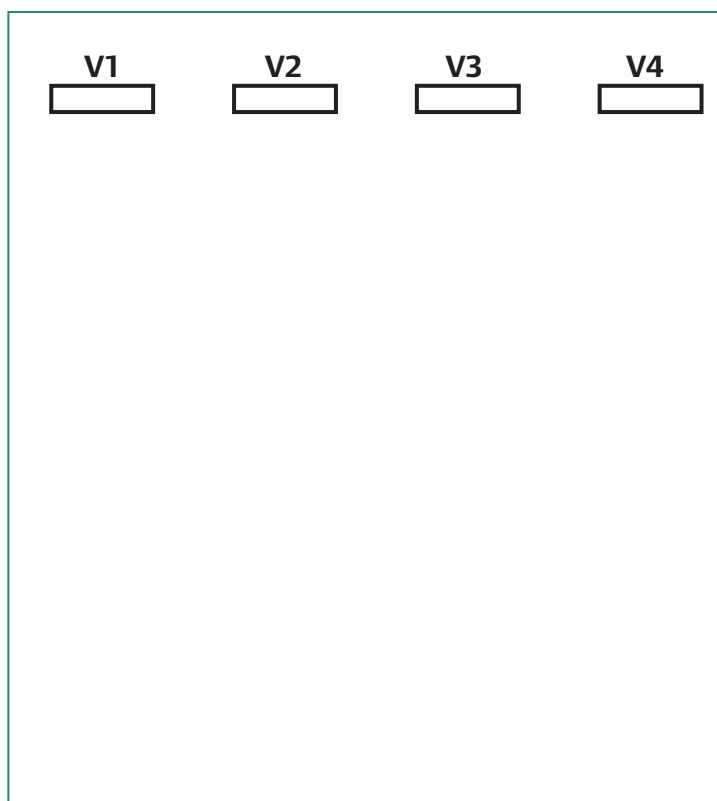
GUIA DO ESTUDANTE

1. Ler o “Material de Apoio”;
2. Ler o “Estudo de Caso” sobre a vacina da dengue;
3. Confeccionar um gel de agarose de acordo com a receita descrita no anexo 1. O professor ou um aluno voluntário fará um gel de agarose;

4. Aplicar em cada poço do gel, 7 μL de cada uma das “Vacinas de DNA”, conforme esquema abaixo. Observe que cada amostra é aplicada intercalando um pocinho vazio, isto porque os corantes difundem-se e bandas contínuas podem ser visualizadas.



5. Correr o gel durante cerca de 15 minutos a 120 volts em tampão TAE 1X. As observações referentes ao gel devem ser realizadas imediatamente, ou seja, o gel não deve ser guardado até o dia seguinte, pois os corantes difundem para fora do gel;
6. Esquematizar na figura abaixo o resultado obtido após a corrida eletroforética:



7. A eletroforese de corantes realizada é uma simulação da eletroforese de separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Para entender quais fragmentos correspondem aos corantes utilizados, ler novamente **Material de**

Apoio e A vacina da dengue: um estudo de caso;

8. Em seguida, ler o anexo **Estudo *in vivo***;

9. Usar as informações do gel de eletroforese e do **Estudo *in vivo*** para responder às perguntas da tabela abaixo:

Vacina	Quais genes estão nesta vacina?	Você usaria esta vacina em um ensaio com humanos?	Por quê?
V1			
V2			
V3			
V4			

MATERIAL DE APOIO

Estrutura e genoma do vírus da Dengue

O vírus da dengue é membro da família *Flaviviridae* e pertencente ao gênero *Flavivirus*. Cada partícula viral consiste de uma cadeia

simples de RNA (genoma viral) dobrada dentro de uma cápsula proteica, denominada nucleocapsídeo, envolta por uma membrana externa conhecida como envelope viral. Ancoradas ao envelope viral, encontram-se as proteínas E e M que controlam a entrada do vírus em células humanas (Figura 1).

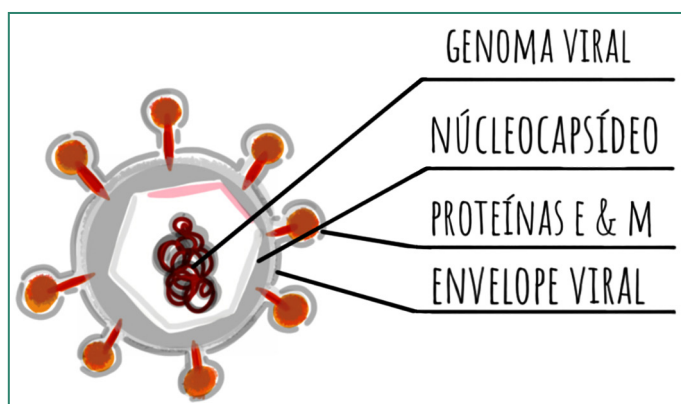


Figura 1. Estrutura do vírus da Dengue. Modificado de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>.

Kilobases: uma unidade de medida do comprimento dos ácidos nucleicos que corresponde a 1000 pares de bases.

Proteínas estruturais: proteínas associadas à estrutura viral e estão presentes no vírus maduro.

O genoma do vírus tem um tamanho aproximado de 11 **kilobases** (Kb) e é dividido em regiões que codificam para **proteínas estruturais** e **não-estruturais**. Entre as proteínas estruturais estão: a proteína C que atua na formação do nucleocapsídeo empacotando o RNA genômico; a proteína M (membrana) e a proteína E (envelope) envolvidas na ligação ao receptor e outros processos de **virulência**. Ambas as proteínas, M e E, estão presentes na superfície viral. Além das proteínas estruturais, o vírus possui sete outras proteínas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, como esquematizado na Figura 2.

Proteínas não-estruturais: proteínas envolvidas no ciclo da replicação viral e outras funções essenciais à manutenção do vírus dentro do hospedeiro.

Virulência: é a capacidade que o vírus possui de se multiplicar dentro do organismo, provocando doença.

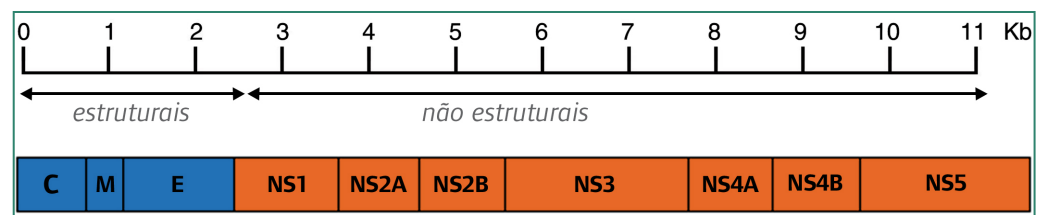


Figura 2.

Representação esquemática do genoma do vírus da dengue. A parte superior representa uma escala com o tamanho do genoma viral (11Kb). Nos boxes, em azul, estão representados os genes que codificam para as proteínas estruturais (C, M e E). Nos boxes, em laranja, estão representados os genes que codificam para as proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5).

Células T helper: um tipo de linfócito T que, quando ativado, possui a capacidade de estimular outras células do sistema imunológico como as células B e as células T citotóxicas.

Células T citotóxicas: tipo de linfócito que, quando estimulado, tem a capacidade de reconhecer e destruir células infectadas.

Macrófago: célula fagocítica presente em muitos tecidos que funciona na imunidade inata pela destruição de organismos invasores e, na imunidade adquirida, como célula apresentadora de antígeno.

Patógeno: vírus ou outro microrganismo que causa uma doença.

COMO O SISTEMA IMUNOLÓGICO ATUA CONTRA ORGANISMOS INVASORES?

Células apresentadoras de antígeno (CAP) fagocitam o patógeno e apresentam parte dele (antígeno) sobre proteínas denominadas **complexo de histocompatibilidade**. Os antígenos apresentados são reconhecidos pelas **células T helper**. Ao reconhecer os antígenos apresentados por CAP, as células T helper podem atuar de 2 formas:

1. Ativam células **T citotóxicas** (T killer)
2. Ativam **células B**

As células B ativadas produzem anticorpos e células de memória. Já as células T citotóxicas ativadas (T killer) atacam outras células que apresentam o **antígeno** (células infectadas, bem como **macrófagos**)

E AS VACINAS?

As vacinas, de um modo geral, devem estimular as defesas naturais do corpo, como a produção de anticorpos, células T citotóxicas, e **células de memória**, sem ocasionar a doença. Esse tipo de defesa é conhecido como defesa específica, ou seja, o sistema imunológico reconhece o antígeno, tendo um efeito de memória. Estimula a infecção que produzirá diversas substâncias a fim de imobilizar o organismo invasor ou permitir através das células de memória, que o corpo, ao entrar novamente em contato com o **patógeno**, seja capaz de combatê-lo.

Células apresentadoras de antígeno (CAPs): células de defesa capazes de fagocitar o patógeno e expor o antígeno em sua superfície o que permite o reconhecimento pelos linfócitos T.

Complexo de histocompatibilidade: complexo proteico presente na superfície das CAPs que exibem o antígeno facilitando o reconhecimento pelos linfócitos T.

Células B: um tipo de linfócito que atua na reposta imune humoral, produzindo moléculas de anticorpos. Após sua ativação, uma parte das células B sofrem diferenciação e se transformam em células B de memória.

Antígeno: é um tipo de molécula estranha ao organismo que desencadeia uma resposta imunológica como, por exemplo, a produção de anticorpos.

Célula de memória: uma célula de um clone de linfócitos de vida longa e que pode responder rapidamente a uma segunda exposição ao mesmo antígeno.

As vacinas de DNA destacam-se por induzir uma resposta imune de amplo espectro tanto humoral quanto celular. Uma vez no interior da célula, mais especificamente no núcleo, o DNA será transcrito e o RNA segue para o citoplasma onde ocorre a tradução de có-

pias da **proteína recombinante**. A proteína recombinante pode então ser expressa na superfície celular e iniciar uma resposta imunológica.

A atuação das vacinas pode ser resumida como mostrado no quadro abaixo:

Proteína recombinante: proteína que foi codificada a partir de um gene recombinante.

Vacina

- Estimula a produção de anticorpos
- Estimula a produção de células T citotóxicas
- Produz células de memória
- Não causa doença

VACINA DA DENGUE: SIMULAÇÃO DE UM ESTUDO DE CASO

Supor a seguinte situação: um estabelecimento de ensino está trabalhando para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue e cada estudante dará uma contribuição nesse processo. O professor disponibilizará quatro potenciais vacinas de DNA para os alunos. No entanto, não se sabe ainda quais combinações dos três genes estruturais do vírus da dengue estão em cada uma delas. O estudante deverá verificar quais são as combinações.

Juntamente com as potenciais vacinas de DNA estão alguns dados coletados de estudos preliminares em animais, quando camundongos foram imunizados com cada um dos três genes estruturais da dengue (genes

C, M e E). O gene C que codifica para uma proteína do nucleocapsídeo viral; o gene M e o gene E que codificam para proteínas da superfície do vírus.

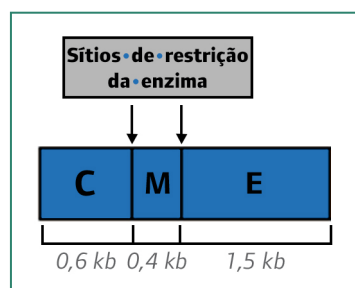
Genes estruturais do vírus da dengue

São disponibilizadas 4 possíveis vacinas da dengue (V1, V2, V3, V4), das quais não se tem certeza das combinações dos três genes estruturais do vírus da dengue que as compõem. Os genes presentes são: o gene C que codifica para uma proteína do nucleocapsídeo viral; o gene M e o gene E que codificam para proteínas da superfície do vírus.

O segmento dos genes estruturais do vírus, abaixo esquematizado, foi isolado e cortado com uma **enzima de restrição**. Os locais de corte estão indicados por setas e os fragmentos gerados possuem, respectivamente, 0,4 Kb e 1,5Kb (Figura 3).

Enzima de restrição:

uma enzima (endonuclease) capaz de reconhecer e cortar moléculas de DNA em sequências específicas de nucleotídeos (sítios de restrição).

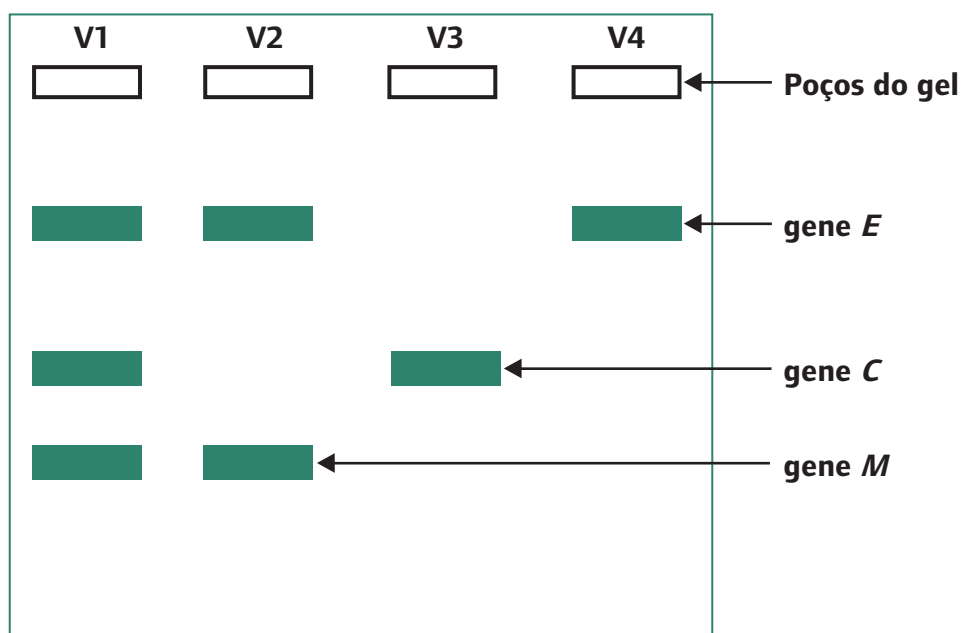


Após a digestão, os fragmentos de DNA gerados podem ser separados por tamanho em um gel quando submetidos a eletroforese. No caso específico, usou-se a

eletroforese em gel de agarose para determinar quais as partes do genoma do vírus estão em cada uma das vacinas de DNA (Figura 4).

Figura 3.

Esquema de um segmento do genoma do vírus da dengue mostrando três genes estruturais C, M e E. As setas indicam os locais de corte da enzima de restrição usada para digerir este segmento de DNA.

**Figura 4.**

Cada banda representa um dos genes que compõem a vacina. A maior banda corresponde ao gene E (1,5 Kb), a banda intermediária corresponde ao gene C (0,6 Kb) e a banda menor corresponde ao gene M (0,4 Kb).

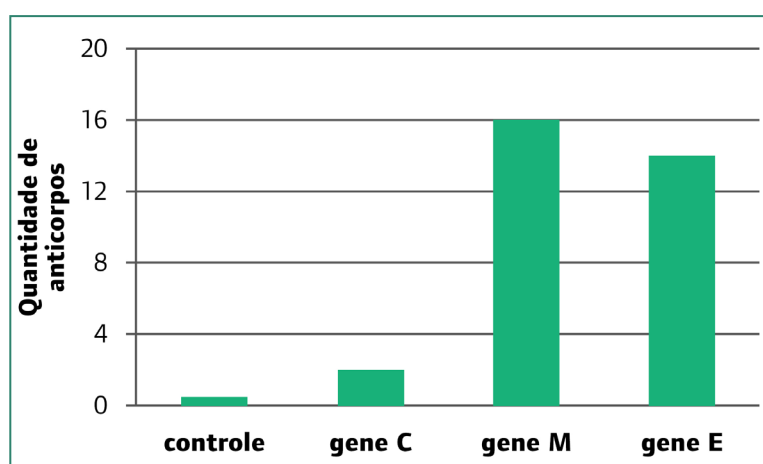
ESTUDO *IN VIVO*

Foi realizado um teste com 10 camundongos nos quais foram injetados vacinas com DNA controle e com os genes C, M e E, a fim de

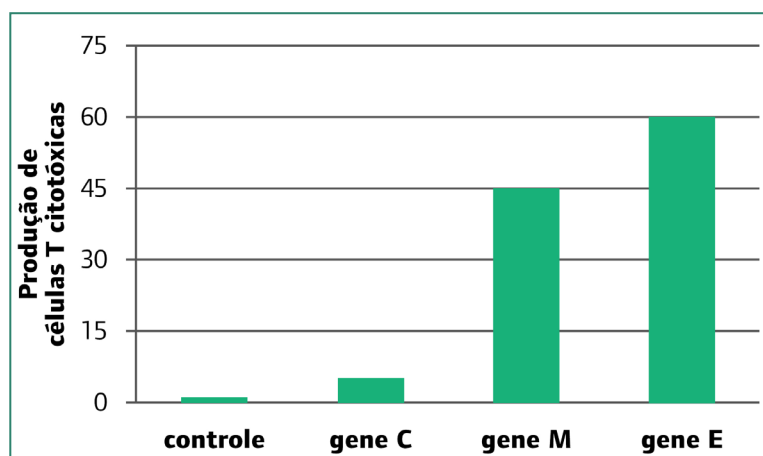
avaliar a resposta imunológica quanto à produção de anticorpos (Figura 5) e de células T citotóxicas (Figura 6). Ao final, foram obtidos os seguintes resultados:

Figura 5.

Quantidade de anticorpos produzidos em camundongos após injeção dos genes C, M e E. O soro de cada animal foi coletado 8 semanas após a injeção.

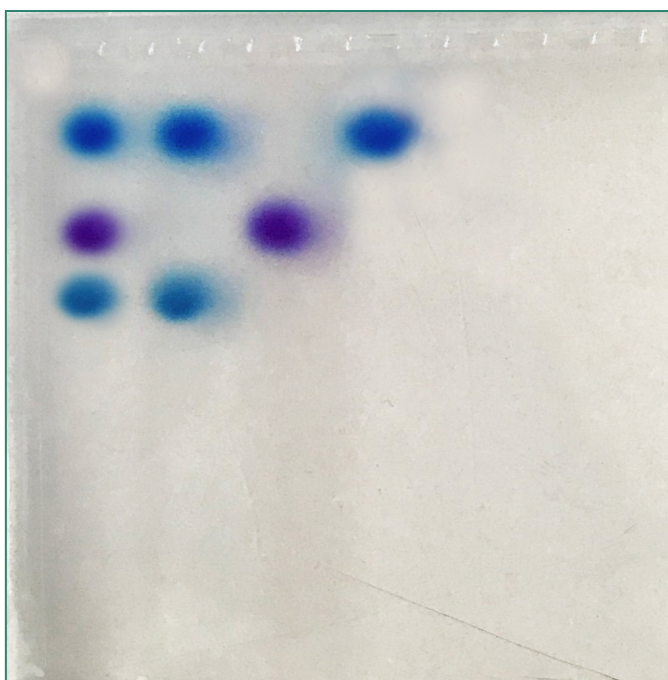
**Figura 6.**

Produção de células T citotóxicas em camundongos após injeção dos genes C, M e E. As células de cada animal foram coletadas 8 semanas após a injeção.



RESPOSTAS

- A separação eletroforética dos corantes que compõem as diferentes vacinas originam o padrão abaixo:



- Após obter as informações do gel de eletroforese e do Estudo in vivo, as respostas às perguntas podem ser respondidas como na tabela abaixo:

Vacina	Quais genes estão nesta vacina?	Você usaria esta vacina em um ensaio com humanos?	Por quê?
V1	E, C, M	Não	Porque contém todos os genes estruturais, podendo causar a doença.
V2	E, M	Sim	Possui os dois genes que mais estimularam a produção de anticorpos e células T citotóxicas ativas.
V3	C	Não	Pois contém apenas o gene que não estimula a produção de anticorpos ou de células T citotóxicas ativas.
V4	E	Sim	O gene E estimula a produção de anticorpos e células T citotóxicas ativas. No entanto, a vacina V2 teria uma resposta melhor por possuir os dois genes que apresentaram os melhores resultados.

Os estudantes devem observar que a imunização dos camundongos com o gene C não estimula tão bem a produção de células T citotóxicas e, portanto não é um bom material / candidato para a produção de uma vacina.

O gene M é o melhor indutor da produção de anticorpos e o gene E, o mais eficiente na indução da produção de células T citotóxicas. Uma vacina de DNA contendo uma mistura dos genes M e E seria a indicada para testes em humanos.

ANEXO 1**Preparação de soluções e gel de eletroforese****Preparo das quatro amostras de corantes que simularão as diferentes "vacinas"**

V1 (20 mL) 4 mL de azul de bromofenol 1% 4 mL de índigo carmim 1% 4 mL de xileno cianol 1% 2 mL de glicerol 0,4 mL tampão de eletroforese TAE 50X	V2 (20 mL) 4 mL de índigo carmim 1% 4 mL de xileno cianol 1% 2 mL de glicerol 0,4 mL tampão de eletroforese TAE 50X
V3 (20 mL) 4 mL de azul de bromofenol 1% 2 mL de glicerol 0,4 mL tampão de eletroforese TAE 50X	V4 (20 mL) 4 mL de xileno cianol 1% 2 mL de glicerol 0,4 mL tampão de eletroforese TAE 50X

(Nota: índigo carmim diluído em TAE tem uma vida útil de cerca de 2 meses).

Preparo do gel de agarose a 1,5% (para 40 mL de gel)

Pesar 0,6 g de agarose, colocar em um erlenmeyer contendo 40 ml de tampão TAE 1X. Fundir a solução no micro-ondas até homogeneizar (evitar fervura). Aguardar a redução da temperatura para aproximadamente 60°C. Despejar a solução de gel na bandeja, posicionar o pente e esperar a solução solidificar. Adicionar tampão TAE 1X até cobrir a superfície do gel.

Tampão TAE 50X

Para o preparo de 1l de TAE 50X:

242 g TRIS base;

57,1 ml ácido acético glacial;

100 ml de solução de EDTA 0,5 M (pH 8.0);

Água destilada até completar 1 litro.

Obs: Para o preparo de 400 ml da solução de TAE 1X a partir da solução estoque TAE 50X, pipetar 8 ml de TAE 50X e adicionar 392 ml de água destilada.