

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

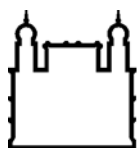
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2:
resposta imune celular em camundongos**

Maysa Leandro de Assis

RIO DE JANEIRO

2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2: resposta imune celular em camundongos

Maysa Leandro de Assis

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora(s): Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Dra. Simone Morais da Costa

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

RIO DE JANEIRO

2020

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2: resposta imune celular em camundongos

Maysa Leandro de Assis

Aprovada em:

07 de abril de 2020

Banca examinadora:

Dra. Andrea Henriques Pons (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ) (**Revisora**)

Dra. Elzinandes Leal de Azeredo (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Dr. Helton da Costa Santiago (Instituto de Ciências Biológicas – UFMG/MG)

Suplentes:

Dra. Luciana Barros de Arruda Hinds (Instituto de Microbiologia – UFRJ/RJ)

Dra. Paula Mello de Luca (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

RIO DE JANEIRO

2020

de Assis, Maysa Leandro.

Vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2: resposta imune celular em camundongos / Maysa Leandro de Assis. - Rio de Janeiro, 2020. xix, 106 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Ada Maria de Barcelos Alves.

Co-orientadora: Simone Morais da Costa.

Bibliografia: f. 89-105

1. dengue. 2. vacinas de DNA. 3. proteína NS1. 4. resposta imune celular. 5. mapeamento de peptídeos. I. Título.

Título em inglês: DNA Vaccine Based on the NS1 Dengue 2 Protein: Cellular Immune Response in Mice

Dedico este trabalho aos meus pais, Flávio e Márcia, que sempre tiveram orgulho de dizer que sua filha estudava na Fiocruz.

Dedico à minha irmã Mayra, minha maior parceira nessa jornada árdua chamada vida, mas tão recompensadora.

Dedico às minhas mestras-mães, Simone e Ada, sem as quais este trabalho nunca teria saído do papel.

Dedico-o também às minhas amigas de laboratório, Paolla Beatriz e Ágatha, cujo auxílio e companheirismo foram o melhor incentivo para continuar nos dias difíceis.

Por fim, dedico-o à pátria brasileira, desejando que algum dia o país possa contar com uma vacina nacional protetora contra a dengue.

“Onde a ignorância se esconde, também estão as fronteiras da descoberta e da imaginação.”

Neil deGrasse Tyson

Agradecimentos

Venho por meio desse espaço agradecer a Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, aos seus coordenadores e em especial à universalmente querida Julimar. Devo à pós-graduação todo o suporte, idas a congressos, cursos, palestras instrutivas e obviamente, a oportunidade de instrução e aprendizado com alguns dos melhores profissionais da ciência no Brasil. Agradeço aos colaboradores do grupo e principalmente à Dra Adriana Vallochi que nos assistiu com tanta prontidão e paciência quanto às nossas análises de citometria de fluxo. Em todos os momentos ela esteve presente com seu saber inesgotável e suas dicas valiosas. Um abraço carinhoso pelas horas de tensão, alegria e sucesso que passamos juntas!

Gostaria de agradecer aos meus colegas de graduação e especialmente aos grandes amigos que fiz durante os anos em que fui aluna do Instituto de Biologia da UFRJ. Giulia, minha amiga desde os tempos de ensino médio, que sempre se mostrou tão generosa e tão sábia comigo. Raisia, nossa querida Hipster, que me despertou para tantas novas ideias e possibilidades na vida. Pedro, que sempre foi uma das melhores companhias na graduação e fora dela. Rafaela, que sempre muito divertida, sabe compreender como ninguém as dificuldades da vida acadêmica. Mariana, que durante os primeiros anos da graduação foi de importância e presença essencial no nosso grupo e que continua sendo até hoje.

Preciso agradecer também às amizades que fiz durante o intercâmbio na universidade Queen Mary em Londres, que tanto me ajudaram durante esse período e que contribuíram para moldar quem eu sou no presente. Às amigas Luana, Aline, Marília, Amanda, Letícia e Vanêssa, obrigada por todo apoio durante esse ano tão crítico para a nossa formação. Obrigada Luana e Aline sobretudo por sua amizade inesgotável e carinhosa. Fico sempre muito surpresa e feliz por nossa relação estar viva até hoje. Um brinde às memórias antigas, e pelas muitas memórias novas que estão por vir!

Agradeço acima de tudo às minhas orientadoras Simone e Ada que me forneceram as melhores ferramentas para a execução desse projeto e que fazem o papel de anjos da guarda na minha trajetória acadêmica. Muito obrigada pelas horas de estudo e orientação. Muito obrigada pela paciência e pela generosidade. Não poderia deixar de agradecer também a todos do laboratório LABIFIV que me ajudaram com seu tempo e seus conhecimentos: Paolla Beatriz, Ágatha, Cristina, aos alunos do laboratório, Beatriz, Pedro, Thiago, Larissa.

Agradeço sobretudo também à Paolla, apelidada carinhosamente de Bia, que se mostrou uma verdadeira irmã durante o meu mestrado. Sua generosidade não conhece barreiras, seja em questões teóricas e práticas da rotina laboratorial quanto nos assuntos mais cotidianos da vida no mundo. Nunca tinha tido o privilégio de conhecer uma alma assim, e desejo do fundo do meu coração que ela tenha muito sucesso na vida.

Por último agradeço à minha família. Aos meus pais Flávio e Márcia, que sempre deram o melhor de si para que eu concluísse o curso de biologia, e à minha irmã Mayra, que sempre forneceu o apoio emocional para que eu seguisse em frente.

A todos vocês, o meu muito obrigada.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade dependente de anticorpo (do inglês “ <i>antibody-dependent cell cytotoxicity</i> ”)
ADE	Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês “ <i>antibody-dependent enhancement</i> ”)
AMP	Peptídeos antimicrobianos (do inglês “ <i>antimicrobial peptides</i> ”)
Amp R	Gene de resistência à ampicilina
APCs	Células apresentadoras de antígenos (do inglês “ <i>antigen presenting cells</i> ”)
BGH	Hormônio de crescimento bovino (do inglês “ <i>bovine growth hormone</i> ”)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês “ <i>bovine serum albumin</i> ”)
CCL	Ligante de quimiocina (do inglês “ <i>chemokine (C-C motif) ligand</i> ”)
CD	Marcador de membrana (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
CDR2 β	cadeia β da região determinadora de complementaridade do receptor TCR
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (UNICAMP)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	Diacetato carboxifluoresceína succinimidil éster (do inglês “ <i>carboxy fluoresceindiacetate succinimidyl ester</i> ”)
ColE1	Origem de replicação de <i>Escherichia coli</i>
Con A	Concanavalina A, proteína mitógena vegetal
CTLA-4	Receptor de proteína associada a linfócito T citotóxico 4, também conhecida como CD152
CXCR5	Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 5 (do inglês “ <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i> ”)
CYD-TDV	Vacina Dengvaxia desenvolvida pela Sanofi-Pasteur
DI-III	Domínios I a III da proteína do envelope de dengue
DCs	Células dendríticas (do inglês “ <i>dendritic cells</i> ”)
DC-SIGN	Molécula intracelular 3 de adesão específica de células dendríticas (do inglês “ <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbin non integrin</i> ”)
DENV	Vírus da dengue (1-4)
DENVax	Vacina desenvolvida pela Takeda (Inviragen)
DMSO	Dimetilsulfóxido (sulfóxido de dimetilo)
dsRNA	Molécula de RNA de fita dupla (do inglês “ <i>Double-stranded RNA</i> ”)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ”)
ELISPOT	Ensaio de imunoabsorção enzimática de pontos (do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i> ”)
Fc γ R	Receptor de membrana da porção Fc de imonoglobulina G
FD	Febre do dengue
FDA	Órgão Fiscalizador dos Estados Unidos, (“ <i>Food and Drug Administration</i> ”)
FHD	Febre hemorrágica da dengue
GAGs	Glicosaminoglicanos (do inglês “ <i>glycosaminoglycans</i> ”)
GH	Hormônio do crescimento humano (do inglês “ <i>growth hormone</i> ”)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (do inglês “ <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> ”)
gp48	glicoproteína (NS1) do vírus da febre amarela
GSK	GlaxoSmithKline

HLA	Antígenos leucocitários humanos (do inglês “ <i>human leukocyte antigen</i> ”)
i.c	Via intracerebral
ICS	Marcação intracelular de citocinas (do inglês “ <i>intracellular cytokine staining</i> ”)
i.m	Via intramuscular
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
IL-12p70	Interleucina 12, composta por suas duas subunidades: IL-12p35 e IL-12p40
INF- α	Interferon-alfa
INF- β	Interferon-beta
INF- γ	Interferon-gama
IRF	Fator regulatório de interferon (do inglês “ <i>interferon regulatory factor</i> ”)
JEV	Vírus da encefalite japonesa (do inglês “ <i>Japanese encephalitis virus</i> ”)
LAMP	Proteína lisossomal associada à membrana (do inglês “ <i>lysosomal-associated membrane protein</i> ”)
LAV	Vacina de vírus vivo atenuado (do inglês “ <i>live-attenuated virus</i> ”)
LB	Meio <i>Luria Broth</i>
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos 1 (do inglês “ <i>monocyte-chemoattractant protein-1</i> ”)
MDA5	Receptor de reconhecimento de padrão RIG-like (do inglês “ <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i> ”) para moléculas dsRNA
MHC-I e II	Complexo principal de histocompatibilidade classes I e II (do inglês “ <i>major histocompatibility complex</i> ”)
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos (do inglês “ <i>macrophage migration inhibitory factor</i> ”)
MSD	Merck Sharpe & Dohme
NGC	Cepa Nova Guiné (DENV)
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NK	Célula exterminadora natural (do inglês “ <i>natural-killer cell</i> ”)
NMRC	<i>Naval Medical Research Center</i>
NOD-SCID	Linhagem de camundongos imunodeficientes em células T, B e NK maduras
NS	Proteína não-estrutural (do inglês “ <i>nonstructural protein</i> ”)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	Quadro de leitura aberta (do inglês “ <i>open reading frame</i> ”)
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês “ <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ”)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
pcENS1	Vetor contendo a sequência líder natural contida na porção 3’ do final do gene codificante da proteína do envelope e a proteína NS1 de DENV2
pcENS1ANC	Vetor contendo a sequência codificante da porção N-terminal hidrofóbica da proteína NS2A e a proteína NS1 de DENV2
pCMV	Promotor do Citomegalovírus
pcTPA	Vetor construído que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA
pcTPANS1	Vetor que contém o gene <i>ns1</i> de DENV2, adicionado da sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA
pcTPANS1AN	Vetor construído a partir do plasmídeo pcTPANS1 contendo a sequência codificante da porção N-terminal hidrofóbica da proteína NS2A
C	
PDK 53	Células de rim de cachorro (do inglês “ <i>dog kidney cells 53</i> ”)
PFU	Unidade formadora de placa (do inglês “ <i>plaque-forming units</i> ”)

prM	Precursor da proteína de membrana
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína de membrana
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão molecular (do inglês “ <i>pattern recognition receptors</i> ”)
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Receptor de reconhecimento de padrão RIG-like (do inglês “ <i>retinoic acid-inducible gene 1</i> ”) para moléculas RNA de fita dupla
pSV40	Promotor Símio-vírus 40
SCD	Síndrome do choque da dengue
sCD40L	Ligante solúvel de CD40
SFC	Células formadoras de pontos/spots (do inglês “ <i>spot-forming cells</i> ”)
SPF	Livre de patógenos (do inglês “ <i>specific-pathogen free</i> ”)
ssRNA	Molécula de RNA de fita simples (do inglês “ <i>single-stranded RNA</i> ”)
substrato AEC	Substrato cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol
STAT	Família de proteínas/fatores de transcrição
STING	Sensor celular de DNA e RNA
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TBK-1	Proteína serina/treonina kinase (do inglês “ <i>TANK-binding kinase 1</i> ”)
TCR	Receptores de células T
TEMRA	Perfil célula T efetora de memória RA (do inglês “ <i>T effector memory RA cells</i> ”)
TetraVax-DV	Vacina contra dengue desenvolvida pelo NIAID
Tfh	Perfil célula T auxiliar de folículo (do inglês “ <i>T follicular helper</i> ”)
Th	Perfil célula T auxiliar (do inglês “ <i>T helper</i> ”)
TLR	Receptores semelhantes a Toll (do inglês “ <i>Toll-like receptor</i> ”)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês “ <i>Tumor necrosis factor alpha</i> ”)
t-PA	peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano
UTR	Região não-traduzida (do inglês “ <i>untranslated region</i> ”)
VEE	Vírus encefalomielite equina venezuelana (do inglês “ <i>Venezuelan equine encephalitis virus</i> ”)
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial A (do inglês “ <i>vascular endothelial growth factor A</i> ”)
VLP	
WNV	Partícula semelhante a vírus (do inglês “ <i>virus-like particle</i> ”)
WRAIR	Vírus da febre do Oeste do Nilo (do inglês “ <i>West Nile virus</i> ”) <i>Walter Reed Army Institute of Research</i>
YF17D	Vírus vacinal da febre amarela
YFV	Vírus da febre amarela (do inglês “ <i>yellow fever virus</i> ”)
ZIKV	Vírus da febre do Zika

RESUMO

A febre da dengue é uma arbovirose pantropical que representa uma grande ameaça à saúde pública. A importância da resposta imune celular contra essa doença vem sendo cada vez mais ressaltada no desenvolvimento de vacinas, principalmente no que diz respeito à geração de respostas protetoras contra as proteínas não-estruturais do vírus. Nosso grupo vem há tempos desenvolvendo vacinas de DNA contra dengue com testes em modelos murinos. Uma destas vacinas é o plasmídeo pcTPANS1, baseada na proteína não-estrutural 1 (NS1) de dengue 2, que foi capaz de induzir altos níveis de proteção e títulos elevados de anticorpos. O presente trabalho teve como objetivo a identificação de peptídeos imunodominantes contidos na proteína NS1 reconhecidos por linfócitos T em camundongos BALB/c imunizados com a vacina pcTPANS1, bem como a investigação do papel desempenhado por essas células ativadas. Observamos que a vacina foi capaz de induzir respostas de células T com produção de IFN- γ frente a uma biblioteca de peptídeos de NS1, através de ensaios de ELISPOT e de marcação intracelular de citocinas (ICS). Identificamos três peptídeos imunogênicos capazes de estimular a produção de IFN- γ em camundongos vacinados com pcTPANS1 (N17, N46 e N67) e outros quatro peptídeos após desafio com DENV2 (N12, N14, N35 e N41), sendo o peptídeo N67 o mais imunodominante dentre estes. Além disso, avaliamos a produção de TNF- α e não observamos um aumento nas porcentagens de células produtoras desta citocina estimuladas com a maioria dos peptídeos da nossa biblioteca, com exceção dos peptídeos N67 e N17, este último somente após desafio com DENV2. Também procuramos identificar respostas de células T citotóxicas após estímulo com os peptídeos de maior significância estatística segundo nossos resultados (N14, N17, N35 e N67), através de ensaios de citotoxicidade *in vivo*. Entretanto, não observamos diferenças nos percentuais de lise das células alvos pulsadas com estes peptídeos entre o grupo vacinado e não-vacinado. Selecionamos o peptídeo mais imunogênico (N67) para um ensaio comparativo com um peptídeo de 9 aminoácidos previamente descrito na literatura, AGPWHLGKL, cuja sequência está contida dentro do peptídeo N67. Observamos um percentual de lise de quase 100% nos camundongos vacinados que receberam os esplenócitos pulsados com este peptídeo, mas uma lise celular de apenas 32% quando pulsados com o peptídeo N67. Quando avaliamos a citotoxicidade por meio da marcação da molécula CD107a, não observamos diferenças significativas na quantidade de células expondo esse marcador após estímulo com tais peptídeos, apesar de ter sido notável um decréscimo na média de intensidade de fluorescência nas células advindas de animais imunizados. Por último, avaliamos a imunogenicidade dos nossos peptídeos em camundongos C57BL/6, de forma a considerar as diferenças oriundas da expressão de um haplótipo de MHC diferente ao do nosso modelo de estudo, e identificamos alguns peptídeos proeminentes na resposta de IFN- γ em ambas as linhagens de camundongos. Para concluir, neste trabalho identificamos peptídeos importantes envolvidos na resposta celular direcionada contra a proteína NS1 de DENV2, ressaltando o papel desse braço da resposta imune na proteção contra dengue conferida pela vacina pcTPANS1.

ABSTRACT

Dengue fever is a pantropical arthropod-borne viral disease whose growing incidence poses as a major threat in terms of public health. The importance of the cellular immune response against this disease has been increasingly highlighted in vaccine development, especially in regard to the generation of protective responses against the viral nonstructural proteins. Over the years, our group has been developing DNA vaccines against dengue and testing them in mouse models. One of these DNA vaccines is the plasmid pcTPANS1, based on the dengue 2 non-structural protein 1 (NS1), which was able to induce high levels of protection and generate high antibody titers. The aim of this work was the identification of immunodominant NS1-derived peptides recognized by T lymphocytes in BALB/c mice immunized with the pcTPANS1 vaccine, as well as the investigation of the role played by the aforementioned activated cells. Our vaccine was able to elicit T-cell responses with IFN- γ production upon stimulation with a NS1 peptide library, as evaluated by ELISPOT and intracellular cytokine staining (ICS) assays. We identified three immunogenic NS1-derived peptides that were able to elicit IFN- γ production in pcTPANS1-immunized mice (N17, N46 and N67) and four other peptides after DENV2 challenge (N12, N14, N35 and N41). Out of those peptides, peptide N67 was the most immunodominant one. Likewise, we evaluated production of TNF- α and we did not observe an increase in the percentage of T-cells producing this cytokine after stimulation with most of the selected peptides with the exception of peptides N67 and N17, the later only after virus challenge. We also sought to identify T-cell cytotoxic responses upon incubation with the peptides of higher statistical significance according to our ELISPOT and ICS results (N14, N17, N35 and N67) by performing *in vivo* cytotoxicity assays. However, we observed no significant differences between the vaccinated and non-vaccinated groups in the percentage of lysis of cells pulsed with these peptides. We then selected the most immunogenic peptide N67 to perform a comparative assay alongside a 9-mer peptide previously described elsewhere in the literature, AGPWHLGKL, whose sequence is contained inside peptide N67. We observed a percentage of almost 100% in cell lysis in vaccinated mice that received splenocytes pulsed with this peptide, whereas we obtained only a 32% cytotoxic percentage when those cells were pulsed with peptide N67. We also evaluated cytotoxicity by measuring CD107a expression, and although we did not observe any statistical difference after stimulation with such peptides, there was a remarkable decrease in mean fluorescence intensity in T-cells from pcTPANS1-immunized mice. Lastly, we assessed the immunogenicity of those peptides in C57BL/6 mice due to the difference in MHC haplotype expression comparing to our BALB/c mouse model and identified some NS1-derived epitopes that feature prominently in the IFN- γ response in cells from both animal strains. To conclude, in this work we identified important peptides involved in the cellular response against the DENV2 NS1 protein, highlighting the role of this branch of the immune response in the protection elicited by our vaccine pcTPANS1 against dengue.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição global da dengue	02
Figura 1.2	Taxa de incidência da dengue por região no país em 2019	05
Figura 1.3	Representação esquemática do genoma do vírus da dengue	06
Figura 1.4	Representação esquemática da partícula do vírus da dengue	06
Figura 1.5	Representação esquemática da proteína NS1 linear e seus domínios	08
Figura 1.6	Ciclo de vida do vírus da dengue	12
Figura 1.7	Representação esquemática de três vacinas vivo-atenuadas contra dengue em fase de ensaios clínicos	18
Figura 3.1	Esquema representativo do plasmídeo pcTPANS1	32
Figura 3.2	Representação esquemática do protocolo de imunização e desafio viral	34
Figura 3.3	Representação esquemática da biblioteca de peptídeos NS1	35
Figura 3.4	Representação esquemática do protocolo do ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	40
Figura 4.1	Produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com peptídeos de NS1	45
Figura 4.2	Número de células produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos NS1, avaliado individualmente em cada camundongo BALB/c imunizado com pcTPANS1	46
Figura 4.3	Produção de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1 em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2	47
Figura 4.4	Número de células produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1, avaliado individualmente nos camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2	48
Figura 4.5	Estratégia de análise das populações de esplenócitos produtores de IFN- γ	49
Figura 4.6	Frequências de células T CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1	50
Figura 4.7	Frequências de células T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ frente a estímulos com os peptídeos de NS1	51
Figura 4.8	Estratégia de análise das populações de esplenócitos produtores de TNF- α	52

Figura 4.9	Frequências de células T CD4 ⁺ produtoras de TNF- α frente ao estímulo com peptídeos de NS1	53
Figura 4.10	Frequências de células T CD8 ⁺ produtoras de TNF- α frente a estímulo com peptídeos NS1	54
Figura 4.11	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vivo</i> utilizando esplenócitos estimulados com os peptídeos N14, N17, N35 e N67	57
Figura 4.12	Análise das populações CFSE _{Low} e CFSE _{High} em esplenócitos de camundongos inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA após transferência de células, pulsados com N14, N17, N35 e N67	58
Figura 4.13	Porcentagem de lise celular induzida nos camundongos que receberam esplenócitos pulsados com os peptídeos N14, N17, N35 e N67	59
Figura 4.14	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vivo</i> utilizando esplenócitos pulsados com os peptídeos N67 e controle	60
Figura 4.15	Análise das populações CFSE _{Low} e CFSE _{High} em esplenócitos de camundongos inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA após transferência de células, pulsados com N67 e peptídeo controle	60
Figura 4.16	Porcentagem de lise celular induzida nos camundongos que receberam esplenócitos pulsados com os peptídeos N67 e controle	61
Figura 4.17	Estratégia de análise das populações de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ expondo CD107a	62
Figura 4.18	Porcentagens de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ presentes nos baços de camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA	63
Figura 4.19	Porcentagens de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ expondo CD107a em camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA	63
Figura 4.20	Intensidade de fluorescência de CD107a-PE das células CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ em camundongos BALB/c inoculados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA	64
Figura 4.21	Média de intensidade de fluorescência de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ expondo CD107a em camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA	65
Figura 4.22	Média de intensidade de fluorescência de células T expondo CD107a após incubação com os peptídeos N67 e controle	66
Figura 4.23	Produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com os peptídeos de NS1	67

Figura 4.24

Produção de IFN- γ frente ao estímulo com os peptídeos de NS1 em células provenientes de camundongos C57BL/6 imunizados com pcTPANS1

68

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1	Critérios para a classificação de dengue com sinais de alerta, de acordo com a classificação da OMS de 2009	03
Quadro 1.2	Lista de vacinas anti-dengue tetravalentes atualmente avaliadas em ensaios clínicos	20

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1	Sequência e localização dos peptídeos de NS1 utilizados	35
Tabela 4.1	Características dos peptídeos de NS1	55
Tabela 4.2	Porcentagem de células T positivas quanto à produção de INF- γ e TNF- α frente ao estímulo com peptídeos de NS1	55

ÍNDICE

1. Introdução	01
1.1 A dengue	02
1.1.1 <i>A Dengue no Brasil</i>	04
1.2 O Vírus da Dengue	05
1.2.1 <i>A proteína NS1</i>	07
1.3 Ciclo Viral	10
1.4 Resposta Imune e Patogênese	12
1.5 Vacinas contra a Dengue	15
1.6 Vacinas de DNA	21
1.6.1 <i>Vacinas de DNA contra a dengue</i>	22
1.6.1.1 <i>Vacinas de DNA desenvolvidas pelo nosso grupo</i>	24
1.7 Modelos Animais Experimentais	25
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1 Produção das Vacinas de DNA	32
3.2 Imunização dos Animais e Desafio com DENV2	33
3.3 Biblioteca de Peptídeos	34
3.4 Isolamento de Esplenócitos	36
3.5 Ensaio de produção de Interferon-gamma ELISPOT (“ <i>Enzyme-linked ImmunoSpot Assay</i> ”)	37
3.6 Ensaio de Marcação Intracelular de Citocinas (“ <i>Intracellular Cytokine Staining</i> ”, ICS)	38
3.7 Teste de Citotoxicidade <i>in vivo</i>	39
3.8 Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	41
3.9 Análises Estatísticas	42

4. Resultados	43
4.1 Identificação de peptídeos imunogênicos da proteína NS1 reconhecidos por células T com produção de IFN- γ em camundongos vacinados com pcTPANS1	44
4.2 Caracterização das populações de linfócitos T ativadas frente ao estímulo com peptídeos de NS1	48
4.3 Avaliação de citotoxicidade <i>in vivo</i> em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 frente a estímulo com peptídeos NS1	56
4.4 Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 frente ao estímulo com os peptídeos N67 e controle ²⁶⁵ AGPWHLGKL ₂₇₃	62
4.5 Identificação de peptídeos imunogênicos da proteína NS1 reconhecidos por células T de camundongos C57BL/6 vacinados com pcTPANS1	66
5. Discussão	69
6. Conclusões	85
7. Perspectivas	87
8. Referências Bibliográficas	89
9. Anexo I - T Cell Responses Induced by DNA Vaccines Based on the DENV2 E and NS1 Proteins in Mice: Importance in Protection and Immunodominant Epitope Identification – <i>Frontiers in Immunology</i> (publicado 23 Julho 2019)	106

1. Introdução

1.1 A Dengue

A dengue é uma arbovirose pantropical transmitida através da picada das fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Seu agente etiológico é o vírus da dengue (DENV), que compreende 4 sorotipos antigenicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Estima-se que cerca de 390 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente pelo vírus da dengue, com a ocorrência de 96 milhões de casos clínicos (Bhatt *et al.*, 2013). Graças à ampla incidência de mosquitos do gênero *Aedes* em áreas tropicais e subtropicais do globo, atualmente mais da metade da população mundial, cerca de 4 bilhões de pessoas, vive em áreas de risco (Figura 1.1) (Gubler, 2011; Guzman & Harris, 2015; Lambrechts *et al.*, 2010; Yam-Puc *et al.*, 2016).

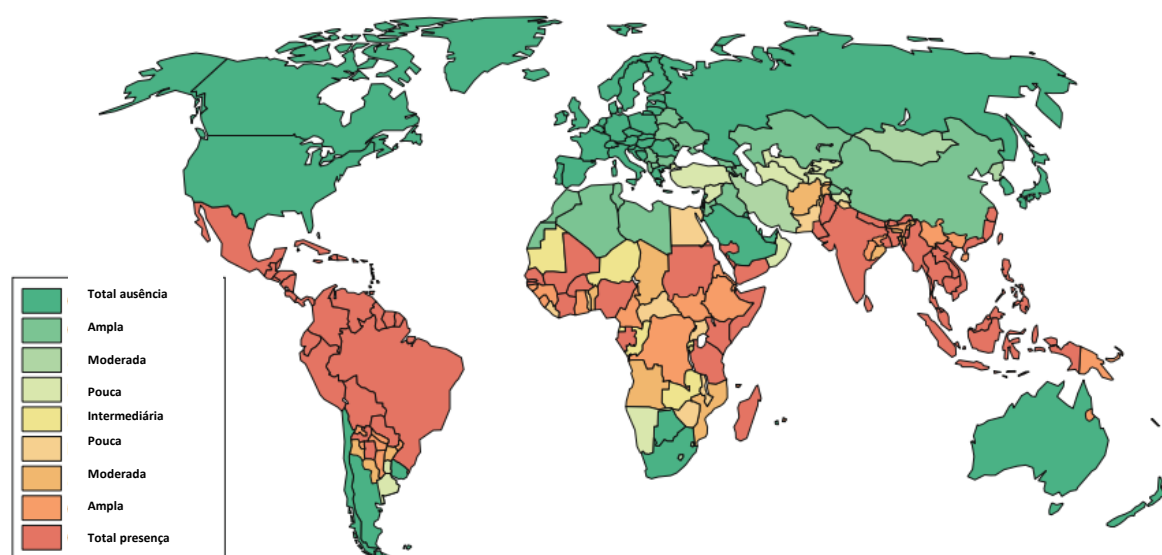


Figura 1.1. Distribuição global da dengue. O gradiente de verde escuro até laranja escuro representa a taxa de incidência de casos de dengue registrados em 2017, onde verde escuro significa total ausência e laranja escuro total presença (adaptado de Flores & Scott, 2018).

A Organização Mundial da Saúde classifica a dengue como: dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave (WHO, 2009). A infecção é geralmente autolimitada, com um período assintomático de 4 a 7 dias de incubação, que é seguido de febre súbita, dor de cabeça, vômito, dor retroorbital, mialgia e dor nas articulações, bem como erupções cutâneas em alguns casos, como petéquias. A avaliação dos sinais de alerta, descritos na tabela a seguir (Tabela 1.1), auxilia na triagem de pacientes que apresentam risco de progressão para as formas graves da doença. Outros critérios para classificação como dengue grave incluem hemorragia grave e dano em órgãos como o fígado e o coração, assim como no sistema nervoso. As formas graves de dengue incluem a febre hemorrágica do dengue (DHF, do

inglês “*dengue hemorrhagic fever*”) e a síndrome do choque da dengue (DSS, do inglês “*dengue shock syndrome*”), que são caracterizadas principalmente pelo extravasamento de plasma da circulação, causado por um aumento de permeabilidade capilar levando à disfunção endotelial em múltiplos órgãos (WHO, 1997).

Quadro 1.1: Critérios para a classificação de dengue com sinais de alerta, de acordo com a classificação da OMS (Adaptado do Manual da Organização Mundial da Saúde, WHO, 2009).

Critérios para a classificação de dengue com sinais de alerta	
Dor Abdominal	Letargia / Inquietação
Vômito Persistente	Aumento do fígado em mais de 2 cm
Acúmulo de fluidos	Aumento de hematócrito concomitante ao
Sangramento de mucosas	decréscimo rápido em plaquetas

Atualmente a OMS considera como dengue grave se o quadro clínico do paciente apresentar uma das três categorias: (1) extravasamento de plasma grave suficiente para causar a síndrome do choque da dengue ou complicações respiratórias, (2) hemorragia grave, (3) comprometimento grave de órgãos. Nos casos de dengue grave, quando os pacientes não recebem tratamento adequado, as taxas de mortalidade podem chegar a 20%. (WHO, 2009; Vannice *et al.*, 2016; Yacoub *et al.*, 2016).

Entretanto, as infecções assintomáticas constituem a maioria dos casos de dengue (aproximadamente 294 milhões de infecções assintomáticas contra 96 milhões de casos clínicos mundialmente). Dos casos que pertencem ao espectro clínico da doença, apenas cerca de 5% constituem casos de dengue grave, correspondendo a aproximadamente 500.000 casos de hospitalização e 12.500 mortes por ano (Bhatt *et al.*, 2013).

A infecção por um sorotipo viral confere uma imunidade homotípica contra esse sorotipo, que dura a vida inteira do indivíduo, apesar de uma imunidade cruzada contra os outros sorotipos também ter sido observada durante os primeiros dois ou três meses após infecção aguda por dengue (Halstead, 1980; Sabin, 1952). Observou-se também que as formas graves da doença ocorrem com maior frequência durante uma infecção secundária heterotípica (com outro sorotipo viral). Estudos demonstraram que 90-95% dos casos de dengue grave ocorrem durante uma infecção secundária, enquanto apenas 5-10% são observados durante uma infecção primária. Ademais, crianças no primeiro ano de vida também apresentam sérios riscos de desenvolvimento das formas graves de dengue,

principalmente as que receberam anticorpos contra DENV passivamente da mãe (Halstead *et al.*, 1970; Jain & Chaturvedi, 2010).

1.1.1 A Dengue no Brasil

Os primeiros relatos de casos de dengue no Brasil foram registrados ao longo do século XIX. Em seguida, com a campanha de erradicação do vetor *Aedes aegypti* liderada por Oswaldo Cruz em 1904, não houve registros de ocorrência da doença até 1981. A reintrodução dos vírus da dengue no Brasil na década de 1980, porém, foi propiciada pelos altos níveis circulantes de vírus da dengue no continente americano e pela re-infestação do vetor *Aedes aegypti* no país em 1977. O primeiro surto de dengue foi causado pelos sorotipos DENV1 e DENV4 e aconteceu em Boa Vista, Roraima, perto da fronteira com a Venezuela. Mas foi apenas em 1986, após a introdução do vírus DENV1 no estado do Rio de Janeiro, que a dengue passou a ser considerada um problema de saúde pública nacional. Dificuldades na implementação de um programa de controle de vetores eficaz em comunidades urbanas resultou na rápida disseminação do vírus e epidemias em vários outros estados (Nogueira, Araújo & Schatzmayr, 2007; Pinheiro & Corber, 1997; Teixeira *et al.*, 2013).

A situação foi agravada em 1990, quando o vírus DENV2 foi introduzido também no estado do Rio de Janeiro, com disseminação subsequente para os outros estados e com o aparecimento de sinais clínicos graves como trombocitopenia e as primeiras mortes por infecção secundária. No ano de 2000 foi isolada uma cepa de DENV3 no município de Nova Iguaçu no Rio de Janeiro e em 2001-2002 houve uma grave epidemia de DENV3 no nosso estado, com pelo menos 1831 casos de dengue grave e 91 mortes registradas (Nogueira, Araújo & Schatzmayr, 2007). O sorotipo de dengue tipo 4 foi reintroduzido no Brasil em 2010 (Nogueira & Eppinghaus, 2011). Atualmente circulam os 4 sorotipos de DENV em quase todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2020).

Em 2019, o número de casos de dengue aumentou em quase 600% em relação ao ano anterior, sendo notificados 1.544.987 casos prováveis. A região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos (1.349,1 casos em cada 100 mil habitantes), seguida da região Sudeste, Nordeste, Norte e Sul (Figura 1.2). Até 30 de dezembro foram confirmados 1.419 casos de dengue grave e 18.740 casos de dengue com sinais de alerta, além de 782 óbitos por dengue no país, sendo 101 por critério clínico epidemiológico (Ministério da Saúde, 2020).

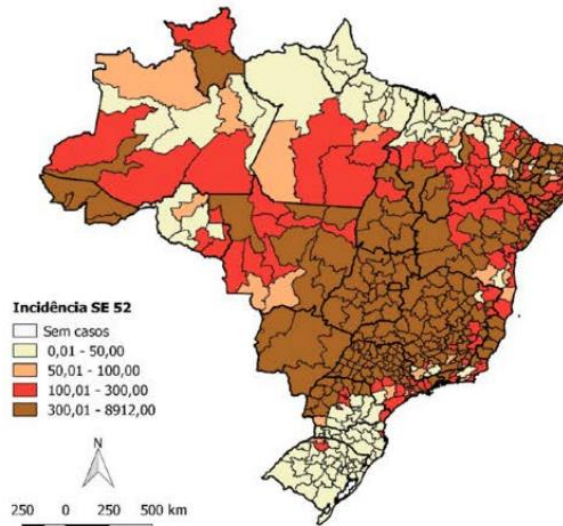


Figura 1.2: Taxa de incidência da dengue por região no país em 2019. O gradiente de branco a marrom indica o crescimento na incidência de casos. Branco: sem casos; amarelo: 0,01-50,00; laranja claro: 50,01-100,00; vermelho: 100,01-300,00; marrom: 300,01-8912,00. (Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, 2020 – acessado em: 05 de janeiro de 2020).

1.2 O Vírus da Dengue

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, grupo que inclui o vírus da encefalite japonesa (JEV), da febre amarela (YFV), da febre do Nilo Ocidental (WNV) e do Zika (ZIKV) (Lindenbach & Rice, 2007). Trata-se de um vírus de RNA fita simples, polaridade positiva, com tamanho de aproximadamente 11 mil pares de bases que contém apenas um quadro aberto de leitura (ORF). Os quatro sorotipos, DENV 1-4, compartilham cerca de 60 a 75% de identidade dos aminoácidos e podem gerar sinais clínicos com diferentes graus de gravidade (Lindenbach & Rice, 2007; Moi *et al.*, 2016; Rivino & Lim, 2016).

O genoma viral contém regiões não codificantes 3' e 5', importantes para regulação da tradução e replicação do vírus, além de uma estrutura de cap G tipo I na sua porção 5'. Esse genoma codifica uma poliproteína de quase 3300 aminoácidos que é clivada em três proteínas estruturais que compõem a partícula do vírion maduro: a proteína do capsídeo (C), a proteína precursora de membrana/membrana (prM/M) e a proteína do envelope (E), além de sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 1.3). Essas proteínas são geradas através da clivagem da poliproteína por proteases da célula hospedeira e da atividade da NS3 viral (Harris *et al.*, 2006).

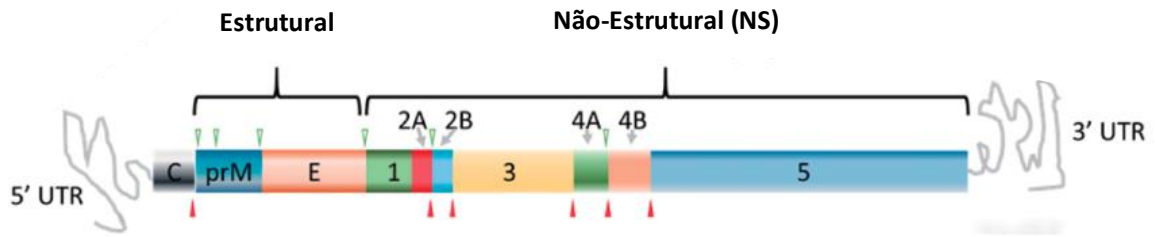


Figura 1.3: Representação esquemática do genoma do vírus da dengue. As proteínas estruturais (C, prM e E) e não-estruturais (NS1, NS2A-B, NS3, NS4A-B, NS5) são geradas a partir da clivagem da poliproteína precursora pelas proteases viral e da célula hospedeira. Os triângulos verdes indicam sítios de clivagem pelas proteases do hospedeiro, enquanto os triângulos vermelhos indicam sítios de clivagem pela protease viral. As setas cinzas indicam a localização das proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B na poliproteína (Adaptado de Tian *et al.*, 2018).

A partícula viral é composta por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, na qual se inserem as proteínas de envelope (E) e membrana (M). Na porção interna do envelope viral há um nucleocapsídeo composto por múltiplas proteínas do capsídeo (C) complexadas ao genoma do vírus (Figura 1.4) (Porter & Raviprakash, 2015; Moi *et al.*, 2016; Yam-Puc *et al.*, 2016).

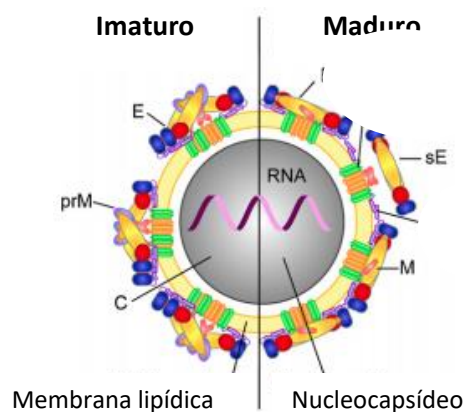


Figura 1.4: Representação esquemática da partícula viral. À esquerda está representada a forma do vírus imaturo, coberto de heterodímeros prM-E, e à direita, o vírus maduro. A clivagem proteolítica de prM resulta na reorganização das proteínas E e na formação de partículas de superfície lisa cobertas por dímeros E. sE: forma solúvel da proteína E (Adaptado de Heinz & Stiasny, 2012).

Dentre as proteínas estruturais, a glicoproteína E é o principal alvo de anticorpos neutralizantes, sendo responsável pela aderência à célula-alvo e fusão com a membrana da mesma (Chambers *et al.*, 1990). O envelope viral é constituído por 90 dímeros da proteína E, distribuídos homogeneamente na superfície da partícula viral, a não ser no seu estado imaturo, quando a proteína prM ainda se encontra associada à E em estruturas de trímeros que protrudem da estrutura viral em “espículas” (Figura 1.4) (Zhang *et al.*, 2003).

As proteínas não-estruturais, por sua vez, são responsáveis pela replicação viral e evasão do sistema imune do hospedeiro. A proteína não-estrutural 1 (NS1) é encontrada na

forma de dímeros no interior da célula infectada e é secretada na forma de hexâmeros (Flamand *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1988). Essa proteína possui um papel importante na replicação do RNA viral, no modelamento de vesículas (formação do complexo replicativo viral) e na montagem das partículas virais (Lindenbach & Rice, 1999; Scaturro *et al.*, 2015; Watterson *et al.*, 2016). Ela será discutida em maior detalhe na seção a seguir.

A proteína não-estrutural 2A (NS2A) está envolvida na síntese do RNA viral e na montagem de partículas virais (Xie *et al.*, 2015), enquanto a proteína não-estrutural 2B (NS2B) se liga à proteína não-estrutural 3 (NS3) e forma o complexo funcional NS2B-NS3, com atividade protease (Falgout *et al.*, 1991). A proteína não-estrutural 4A (NS4A) possui um papel de alteração de membranas durante a formação do complexo replicativo viral (Miller *et al.*, 2007), enquanto a proteína não-estrutural 4B (NS4B), por sua vez, interage com o domínio helicase da proteína NS3, sendo necessária a sua presença para que o domínio helicase desta última seja funcional (Umareddy *et al.*, 2006).

Ambas as proteínas não-estruturais 3 e 5 (NS3 e NS5) desempenham atividade enzimática essencial para a replicação viral. A proteína NS3 funciona como protease e helicase. Seu domínio N-terminal é essencial para a atividade protease (Falgout *et al.*, 1991), sendo responsável por clivar a poliproteína precursora viral nas proteínas estruturais e não-estruturais. Sua ponta C-terminal contém o domínio de atividade helicase (Umareddy *et al.*, 2006), necessária para o desenovelamento do dúplex de RNA durante a replicação. A proteína NS5 é a maior e a mais conservada proteína dentro dos flavivírus (Chambers *et al.*, 1990). Ela funciona como uma RNA polimerase dependente de RNA viral, cujo domínio N-terminal contém uma metiltransferase que é responsável pela estrutura de cap G tipo I na porção 5' dos novos genomas virais (Issur *et al.*, 2009).

1.2.1. A Proteína NS1

A proteína não-estrutural 1 (NS1) de DENV é uma glicoproteína de 48 kDa essencial para a viabilidade do vírus (Chen *et al.*, 2018; Flamand *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1989). Ela é importante para a modulação da replicação viral, sendo observada a sua co-localização com moléculas de RNA de dupla fita (dsRNA) (Scaturro *et al.*, 2015; Watterson *et al.*, 2016; Youn *et al.*, 2012). Sua interação com as proteínas não-estruturais NS4A e NS4B sugere um papel no transporte/modelamento de vesículas para a formação do complexo de replicação viral (Lindenbach & Rice, 1999; Youn *et al.*, 2012).

Na célula infectada, a proteína NS1 é expressa inicialmente como um monômero. Uma vez dentro do lúmen do retículo endoplasmático, ela sofre modificações pós-

tradicionais, como a adição de carboidratos ricos em manose, sendo então dimerizada e direcionada para três locais: os sítios de replicação viral, a membrana citoplasmática e o meio extracelular. Como dímero (Figura 1.5A), ela pode ser encontrada associada à membrana do retículo endoplasmático de forma a interagir com outras proteínas virais transmembranas (Akey *et al.*, 2014; Youn *et al.*, 2012). De fato, Scaturro e colaboradores identificaram uma interação entre NS1 e as proteínas E e prM, sugerindo um papel de auxílio na montagem das partículas virais ao modelar mudanças conformacionais necessárias ao envelopamento de nucleocapsídeos, devido à sua atividade lipomodeladora (Scaturro *et al.*, 2015).

A proteína NS1 é a única proteína viral continuamente secretada para fora da célula infectada, sendo grande parte secretada como partículas proteolipídicas solúveis hexaméricas em formato de barril (Flamand *et al.*, 1999). Esses hexâmetros são compostos por três dímeros que formam uma cavidade central hidrofóbica carregada de moléculas lipídicas; uma composição similar a uma lipoproteína de alta densidade (Gutsche *et al.*, 2011) (Figura 1.5B). A estrutura lipídica ao centro pode auxiliar a proteína a se ligar à membrana das células através de uma associação com glicosaminoglicanos (GAGS) (Avirutnan *et al.*, 2007).

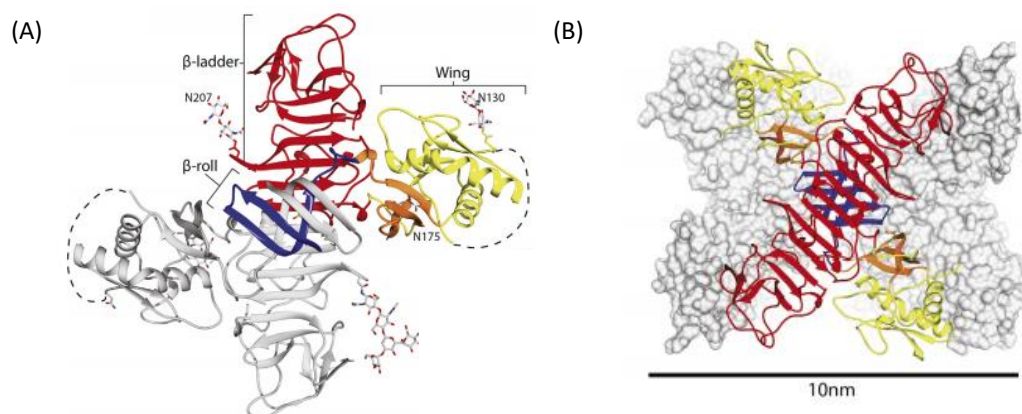


Figura 1.5 Representação esquemática da proteína NS1 linear e seus domínios. Domínio I representado em vermelho), domínio II em azul e domínio III em amarelo. Representação da forma em dímero (A) e hexâmero (B) (Modificado de Watterson *et al.*, 2016).

A proteína NS1 é encontrada na circulação de pacientes infectados por até 9 dias após o começo da doença, mas pode persistir por até 18 dias em alguns casos (Alcon *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2000). Os níveis séricos dessa proteína já foram positivamente correlacionados com títulos de viremia e com a gravidade da doença (Alcon *et al.*, 2002; Avirutnan *et al.*, 2006; Libraty *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2000).

Por sua capacidade de ligação e modificação das proteínas do sistema complemento, como a proteína regulatória H, fator C4 ou clusterina, foi postulado que a proteína NS1

desempenhasse um papel importante para a imunoevasão viral (Avirutnan *et al.*, 2010; 2011). Também já foi proposto um possível papel da NS1 nos casos de extravasamento de plasma em dengue grave, associado ao potencial dessa proteína em ativar a via de complemento através da geração de anafilotoxinas e do complexo terminal do complemento SC5b-9. (Avirutnan *et al.*, 2006).

Além disso, foi proposto que anticorpos anti-NS1 participassem dos processos de apoptose e danos às células endoteliais graças a sua capacidade de reação cruzada com antígenos da superfície dessas células (Cheng *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2002). No entanto, essa hipótese perde sua força quando é posto em perspectiva o tempo em que anticorpos contra NS1 circulam no organismo do indivíduo infectado e a natureza transitória dos danos homeostáticos e da permeabilidade vascular, em geral, superada após um ou dois dias em pacientes que recebem tratamento com fluidos adequados (Halstead, 2007). De fato, em um estudo realizado em camundongos, a alteração de permeabilidade endotelial foi impedida através do bloqueio de NS1 por vacinação e por anticorpos monoclonais anti-NS1 (Beatty *et al.*, 2015).

Uma das hipóteses propostas para explicar o distúrbio na barreira endotelial é a ativação do receptor TLR4 induzida pela proteína NS1, como visto em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), levando à produção das interleucinas 6 e 8, que contribuem para disfunção da barreira ao alterar as junções celulares (Modhiran *et al.*, 2015). Porém, outro estudo realizado em um modelo murino deficiente em TLR4 não observou diferenças nos níveis de extravasamento de plasma em relação a camundongos selvagens após inoculação de NS1, o que indica a existência de outros fatores envolvidos na patogênese (Glasner *et al.*, 2017).

De fato, outros mecanismos já foram propostos, entre eles a secreção do fator inibitório de migração (MIF) induzida pela NS1 em macrófagos, levando a uma disrupção das junções entre as células endoteliais através de autofagia (Chen *et al.*, 2016; Puerta-Guardo *et al.*, 2019), e a degradação do glicocálice endotelial mediado por enzimas como heparanase-1 e catepsina L, cujo aumento da expressão foi induzido por NS1, como visto em modelo murino e *in vitro* com células endoteliais humanas (Glasner *et al.*, 2017; Puerta-Guardo *et al.*, 2016).

Outros autores sugerem que a proteína NS1 esteja associada à coagulopatia e trombocitopenia nos casos de dengue grave. Foi observado que anticorpos anti-NS1 podem ocasionar uma reação cruzada com a proteína dissulfeto isomerase (PD1) a partir de uma porção presente na região C-terminal da proteína NS1. Esses anticorpos seriam capazes de inibir a atividade isomerase da proteína, levando à agregação de plaquetas (Cheng *et al.*,

2009) e a sua opsonização, propiciando a fagocitose por macrófagos (Wan *et al.*, 2016). Complexos NS1/trombina já foram encontrados em grandes níveis séricos em pacientes e foi observado que a ligação de NS1 à protrombina impediu sua ativação (Avirutnan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012).

Em resumo, o exato papel desempenhado pela NS1 na patologia da dengue ainda permanece indefinido. Observações clínicas indicam que a antigenemia de NS1 parece permanecer por mais tempo em casos de infecção primária por DENV do que em infecções secundárias, diretamente em oposição ao maior risco de dengue grave observado em infecções secundárias (Tricou *et al.*, 2011). Fato é que, por seu potencial imunogênico, a proteína NS1 atualmente é um alvo importante de terapias antivirais e vacinas anti-DENV. Anticorpos anti-NS1 oferecem diferentes mecanismos terapêuticos quando comparados com anticorpos anti-E e prM/M: os anticorpos anti-NS1 podem tanto reduzir a propagação viral durante os estágios iniciais da infecção, a partir da indução de citotoxicidade dependente de anticorpos, quanto eles podem atenuar os efeitos causados pelo acúmulo da proteína NS1 no organismo durante os estágios tardios (Beatty *et al.* 2015; Wan *et al.*, 2014).

Como alvo antigênico, a proteína NS1 apresenta a vantagem de ser expressa tanto ancorada na superfície de células infectadas como homodímero, quanto secretada na circulação como hexâmero, sendo capaz de induzir uma resposta imune humoral e celular. Além disso, estudos mostram que tanto a vacinação quanto a imunização passiva, realizada através da transferência de anticorpos anti-NS1, foram capazes de induzir proteção em modelos murinos (Gonçalves *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2017).

Schlesinger e colaboradores foram os primeiros a comprovar a eficácia de uma vacina baseada na proteína NS1 nos anos 80, a partir da imunização com a glicoproteína gp48 (NS1) do vírus da febre amarela em camundongos e primatas não-humanos (Schlesinger *et al.*, 1985). Em outro estudo, eles demonstraram que a imunização com a proteína NS1 de DENV2 foi capaz de induzir proteção contra infecção homóloga por DENV (Schlesinger *et al.*, 1987). De lá até a atualidade, diversas outras vacinas baseadas na proteína NS1 foram testadas, incluindo diferentes abordagens como as vacinas de DNA (Costa *et al.*, 2006; 2007; Wu *et al.*, 2003).

1.3 Ciclo Viral

Durante o repasto sanguíneo de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes* infectadas, o DENV é inoculado na derme e epiderme, e algumas partículas virais são injetadas diretamente na circulação sanguínea, infectando monócitos. Na epiderme, queratinócitos e

células de Langerhans são infectadas, enquanto na derme fibroblastos, células dendríticas residentes e mastócitos constituem os primeiros alvos da infecção (Garcia *et al.*, 2017). Alguns estudos também evidenciaram a presença de DENV em hepatócitos e células de Kupffer no fígado, bem como no cérebro de pacientes com quadro de complicação neurológica (Heinz & Stiasny, 2012; Rivino & Lim, 2016).

A figura 1.6 sintetiza as etapas da replicação viral. A adesão do vírus à célula alvo é mediada por receptores que interagem com o domínio III da proteína do envelope viral, ativando o processo de endocitose dependente de clatrina. Entre as moléculas que já foram descritas como participantes do processo, destacam-se os receptores heparan-sulfato, os receptores DC-Sign, presentes nas células dendríticas e macrófagos, e os receptores de manose (Harris *et al.*, 2006). Durante a infecção secundária, a entrada viral também pode ocorrer através dos receptores Fc γ (Fc γ R) de anticorpos, presentes na superfície das células-alvo, no processo denominado de aumento da replicação dependente de anticorpos (ADE, do inglês “*antibody-dependent enhancement*”), que será abordado mais adiante (item 1.4).

No endossoma, a queda do pH induz a fusão da membrana do vírus com a membrana endossomal a partir de uma mudança conformacional da proteína E, passando do estado de dímero para trímero e expondo o peptídeo de fusão (Harris *et al.*, 2006; Stiasny & Heinz, 2012). O nucleocapsídeo é inserido no citoplasma da célula hospedeira, levando à liberação do genoma de RNA viral e das proteínas virais. No retículo endoplasmático (RE), a molécula de RNA de fita simples positiva é traduzida em uma poliproteína precursora, que é clivada pela protease viral e as do hospedeiro nas proteínas estruturais e não-estruturais. Após essa etapa, o RNA viral é transcrito pela proteína NS5 em algumas fitas simples de RNA negativo intermediário, que servem de molde para a síntese de várias moléculas de RNA positivas (Hodge *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2018).

As proteínas virais sintetizadas induzem um remodelamento das membranas intracelulares, criando estruturas distintas, onde a replicação do RNA viral e a montagem dos vírions podem acontecer (Paul & Bartenschlager, 2013). A montagem do vírion acontece então dentro do retículo endoplasmático, onde 180 cópias de proteínas prM e E se associam em espículas triméricas, cada uma contendo três unidades de prM e três unidades da proteína E. O novo RNA viral é associado à proteína do capsídeo e é empacotado junto aos vírions envelopados. A proteína prM funciona como uma chaperona que protege o *loop* hidrofóbico de fusão da proteína E, impedindo que esta se fusione prematuramente com membranas do interior da célula hospedeira. O vírion é então transportado pelas membranas do complexo de Golgi, onde o ambiente ácido e a protease furina clivam a proteína prM em M e o polipeptídeopr (Christian *et al.*, 2013).

Após a clivagem da proteína prM no Golgi, entretanto, a proteína E ainda mantém interações com pr e M, sendo apenas após a exocitose da partícula viral da célula infectada, via brotamento, que o pH neutro do ambiente extracelular dissocia E e pr nas partículas virais, tornando-a capaz de infectar novas células (Christian *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2006).

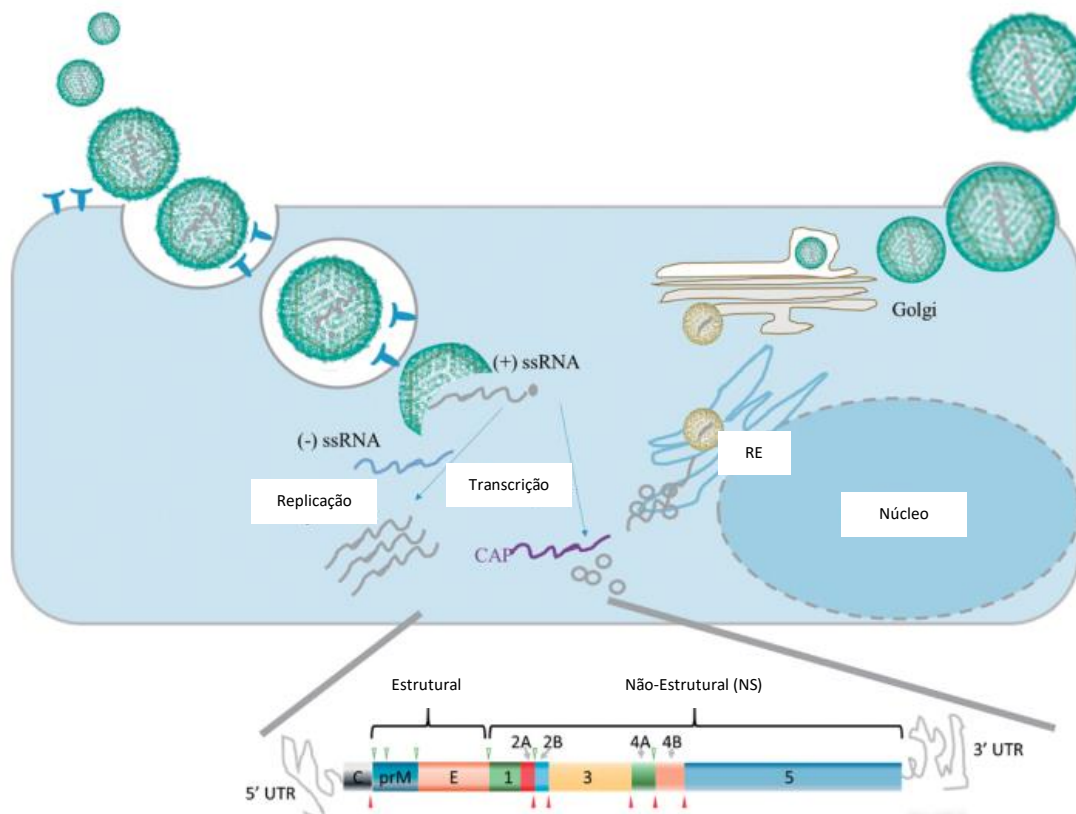


Figura 1.6: Ciclo de replicação do vírus da dengue. O vírus da dengue infecta as células hospedeiras via endocitose mediada por receptores. Após acidificação da vesícula e mudanças conformacionais nas proteínas virais prM/M e E, o RNA viral é liberado no citosol e migra para o retículo endoplasmático onde a tradução, replicação e a montagem das partículas acontecem. Os vírions são transportados para o aparelho de Golgi, onde eles são submetidos à clivagem proteolítica que resulta na maturação viral. De lá, eles são exportados através do sistema secretório da célula hospedeira (Adaptado de Tianet *et al.*, 2018).

1.4 Resposta Imune e Patogênese

Uma vez que o DENV infecta as células alvo, ele ativa receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs) diferentes como RIG-I e MDA5 que reconhecem RNA viral/RNA de dupla fita (dsRNA) citoplasmático (Nasirudeen *et al.*, 2011). Seu RNA de dupla fita ativa o receptor *toll-like* tipo 3 (TLR3), e seu RNA de fita simples (ssRNA) ativa TLR7 e TLR8 (Sariol *et al.*, 2011). DENV também ativa o sistema complemento e TLR9 (Schoggins *et al.*, 2014).

A ativação desses receptores PRR inicia a resposta antiviral através de uma produção inicial alta de interferon β (IFN- β), uma produção relativamente baixa de interferon γ (IFN- γ) e peptídeos antimicrobianos (AMP) em células como queratinócitos (Surasombattana *et*

al., 2011). Nos fibroblastos a infecção induz a produção de IFN- β , fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 4 (IL-4), IL-1- β , ligante de quimiocina 2 (CCL2) e ligante de quimiocina 5 (CCL5) (Bustos-Arriaga *et al.*, 2011). Por outro lado, células como mastócitos promovem a secreção de CCL5, IL-8, IL-6, IL-10, IL-25, bem como do fator de crescimento endotelial (VEGF-A). Este último fator ativa a proliferação endotelial e está associado com o aumento da permeabilidade vascular (Troupin *et al.*, 2016).

Uma vez a resposta antiviral acionada, ocorre uma migração de monócitos circulantes para o sítio de infecção, bem como de células dendríticas. Essas células passam a aumentar a expressão do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) (Libraty *et al.*, 2001). O processo da ativação da imunidade inata induz a migração de algumas dessas subpopulações para os linfonodos, para apresentação de antígenos aos linfócitos *naïve*, induzindo ativação, expansão clonal e diferenciação para os fenótipos distintos de células T efetoras e a produção de células T de memória. Foi observado em humanos que grande parte das células T ativadas por infecção por DENV são polarizadas para um fenótipo *T helper 1* (Th1) (Hatch *et al.*, 2011). Essa polarização também foi observada em pacientes imunizados com uma vacina anti-DENV de vírus vivo atenuado, onde as citocinas circulantes eram polarizadas para o perfil Th1 (Gwinn *et al.*, 2003). Linfócitos T CD4⁺ Th1 produzem citocinas tais como IFN- γ , TNF- α , interleucina 2 (IL-2) e quimiocinas como MIP-1 β . A resposta de células T CD8⁺ e de linfócitos B é aumentada durante o controle da infecção (Kurane *et al.*, 1991; St John & Rathore, 2019). Simultaneamente, linfócitos T CD8⁺ (CD38⁺HLA-DR⁺) ativam e exercem atividade citotóxica mediada por TNF- α , granzimas e perforina, promovendo o *clearance* viral e a eliminação de células infectadas (De Matos *et al.*, 2015; Yauch *et al.*, 2009). Durante uma infecção primária, as respostas de células T atingem seu pico durante a fase de defervescência, após a ativação e expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos para o sorotipo da infecção (Friberg *et al.*, 2011).

A resposta imune humoral, por sua vez, se inicia aproximadamente seis dias após a picada do mosquito (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Durante uma infecção primária, os níveis de imunoglobulinas (Ig) M (IgM) específicas para antígenos de DENV aumentam, o que geralmente persiste no soro dos indivíduos infectados por 30 a 90 dias. A partir do décimo dia de infecção há um aumento dos níveis de anticorpos IgG específicos, que podem ser detectados por muitos anos ao longo da vida do indivíduo (Guzman & Istúriz, 2010; Nagesh *et al.*, 2011). Na infecção secundária, por outro lado, os títulos de IgG aumentam rapidamente (Nagesh *et al.*, 2011; Murphy & Whitehead, 2011).

Altos títulos de anticorpos neutralizantes foram tradicionalmente associados com proteção contra o dengue. Entretanto, em uma infecção secundária heterotípica, isto é, com

um sorotipo diferente, anticorpos direcionados contra o sorotipo da infecção viral primária (principalmente contra as proteínas virais do envelope e de membrana) formam um complexo imune com as partículas virais. Esse processo facilita a infecção de células-alvo de DENV que possuem receptor Fc (FcR), como monócitos e macrófagos, resultando em um processo denominado aumento da replicação dependente de anticorpos (ADE, do inglês “*antibody-dependent enhancement*”) (Halstead, 1977). Além disso, anticorpos anti-DENV também podem contribuir para a lise direta de células infectadas a partir do fenômeno conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC, “*antibody-dependent cellular cytotoxicity*”) através da ativação de células natural killer (Kurane *et al.*, 1984).

Concomitantemente, em uma infecção secundária heterotípica por DENV, células T de memória e células B homotípicas específicas para o sorotipo prévio de infecção são ativadas. Enquanto respostas de anticorpos neutralizantes são direcionadas contra epítomos presentes em proteínas estruturais, as proteínas não-estruturais NS1, NS3 e NS5 são importantes alvos da resposta imune celular. A resposta de células T direcionadas ao sorotipo prévio de infecção podem não conferir proteção contra o novo sorotipo, mas ao contrário, desencadear cascatas imunes responsáveis pelo aparecimento de sintomas dos quadros de dengue grave. Tal fenômeno é chamado de pecado original antigênico (do inglês “*original antigenic sin*”) (Mongkolsapaya *et al.*, 2003).

De acordo com essa hipótese, células T geradas durante uma infecção primária reconhecem o sorotipo de DENV responsável pela infecção secundária, mas apresentam baixa afinidade, sendo, portanto, pouco funcionais e propensas a induzir imunopatologia ao invés de proteção (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Essas células T de memória estão presentes em grandes quantidades e são facilmente ativadas, competindo com as células que possuem alta afinidade pelo sorotipo secundário. Alguns estudos sugerem que a estimulação dessas células DENV-específicas com peptídeos heterólogos resulta na produção diferenciada de citocinas: maior produção de TNF- α e menor produção de IFN- γ , além de degranulação em níveis sub-ótimos (Duangchinda *et al.*, 2010; Green *et al.*, 1999; Libraty *et al.*, 2002; Mongkolsapaya *et al.*, 2006). Entretanto, novos estudos demonstram que a resposta de células T é favoravelmente protetora, com a ativação cruzada de células T levando ao direcionamento da resposta para epítomos conservados ao invés de soro-específicos (Weiskopf *et al.*, 2013). Ademais, estudos que empregaram transferência adotiva de células T CD8⁺ e T CD4⁺ em modelos murinos de dengue demonstraram a importância dessas células na redução de carga viral e proteção contra agravamento da doença (Yauch *et al.*, 2009, 2010; Zellweger *et al.*, 2015).

Diretamente contrária à teoria de baixa avidéz apresentada por células T diante a epítomos heterólogos, entretanto, é a observação que em indivíduos dengue-ímenes saudáveis em regiões hiperendêmicas a resposta de células T é fortemente direcionada contra epítomos conservados entre os quatro sorotipos de DENV, enquanto o desenvolvimento de respostas direcionada contra epítomos sorotipo-específicos parece ser comprometido (Weiskopf *et al.*, 2013). Diante da literatura recente, os autores da teoria do pecado original atualmente postulam que a geração rápida de uma resposta de células T contra o vírus da dengue seja protetora, enquanto que a geração tardia de populações de linfócitos com baixa avidéz e enviesados para a produção de citocinas inflamatórias predisponha à imunopatologia (Screaton *et al.*, 2015).

1.5 Vacinas contra a dengue

Diante da ineficácia de métodos de controle dos vetores da dengue, a vacinação permanece como a opção mais viável para a prevenção contra o dengue. Em 2007 a OMS desenvolveu diretrizes para a avaliação clínica de vacinas contra dengue em países endêmicos. Foi recomendado como objetivo primário a proteção contra dengue sintomática, e como objetivos secundários a eficácia contra os 4 sorotipos virais, a proteção conferida após uma de duas ou mais doses de vacina, redução no índice de hospitalização por dengue e na gravidade dos casos de dengue confirmados por laboratório (WHO, 2007). Atualmente, existe uma vacina de vírus quimérico atenuado contra a dengue licenciada no mercado e diversas outras estratégias vacinais estão em desenvolvimento, incluindo vacinas de subunidade recombinante, vacinas de DNA, *virus-like particle* (VLP), vacinas vetorizadas por vírus, vírus inativado, vírus vivo atenuado, bem como *prime-boost* heterólogo. Esta última estratégia corresponde à imunização em dois momentos com vacinas de abordagens diferentes contendo o mesmo antígeno, como por exemplo, uma dose de vacina de vírus vivo-atenuado seguida por uma posterior dose com uma vacina de DNA (Saade & Petrovsky, 2012).

Em dezembro de 2015 foi licenciada no México, Brasil e Filipinas a primeira vacina anti-dengue no mundo, a Dengvaxia (CYD-TDV), desenvolvida pela Sanofi-Pasteur. No ano seguinte essa vacina foi licenciada também em El Salvador, Costa Rica, Paraguai, Guatemala, Peru, Indonésia, Tailândia e Singapura e em 2018 foi aprovada para comercialização nos países da União Europeia. Em maio de 2019 a vacina foi aprovada para uso também dentro do território dos Estados Unidos (FDA, 2019). Esta vacina compreende o esqueleto do vírus vacinal da febre amarela vacinal (YF17D) e as proteínas estruturais

prM/M e E dos 4 sorotipos de dengue (Figura 1.7). O esquema de vacinação é de 3 doses da vacina tetravalente, com intervalos de 6 meses, sendo liberada apenas para indivíduos de 9 a 45 anos (Flipse & Smit, 2015; Liu *et al.*, 2016; Vannice *et al.*, 2016).

Estudos pré-clínicos e de fase I indicaram que a formulação era segura, com pacientes apresentando baixas taxas de viremia após a imunização. A vacina foi licenciada no final de 2015 após um estudo de fase IIb realizado na Tailândia, seguido por dois testes clínicos de fase III em cinco países da Ásia e cinco países da América Latina. Esses estudos envolveram aproximadamente 35 mil crianças de idades entre 2 e 16 anos, onde foi observada a indução de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos de DENV (Sabchareon *et al.*, 2012). Entretanto, a proteção geral da vacina ficou em torno de 65,6%, sendo 83,2% de eficácia contra o sorotipo 4, 73,6% contra o sorotipo 3, 58,4% contra DENV1 e apenas 47,1% contra DENV2. Além disso, a melhor resposta foi encontrada em participantes que já haviam sido infectados com dengue (78,2% de proteção) quando comparado com participantes *naïves* (38,1% de proteção) (Hadinegoro *et al.*, 2015). Foi observado elevado risco de hospitalização por dengue grave em crianças abaixo dos 9 anos, além de uma menor eficácia em soronegativos pertencentes a esse grupo (14,4% versus 52,5% em soronegativos com mais de 9 anos de idade), o que levou a não-inclusão dessa faixa etária no esquema de vacinação (Hadinegoro *et al.*, 2015).

Em 2018, a Sanofi Pasteur publicou os resultados obtidos das análises de amostras de sangue de indivíduos vacinados, coletadas 13 meses após a primeira dose (Sridhar *et al.*, 2018), sendo observada uma forte correlação entre o risco de dengue grave e indivíduos soronegativos na época da vacinação. Conseqüentemente, a OMS passou a recomendar a partir de abril de 2018 que fosse realizado um mapeamento pré-vacinação nos países que adotassem a vacina CYD-TDV, de forma que apenas indivíduos soropositivos para dengue fossem vacinados (WHO, 2018). Recentemente a Sanofi Pasteur publicou os resultados de um estudo realizado 4 anos após os três testes clínicos mencionados anteriormente. Foi confirmado que indivíduos soronegativos para dengue estão sujeitos a maior risco de desenvolvimento de dengue grave, independente da idade no momento da vacinação (Arredondo-Garcia *et al.*, 2018).

Duas outras vacinas de vírus quimérico vivo-atenuado se encontram atualmente em ensaios clínicos de fase III. Elas são chamadas de “nova geração de vacinas contra a dengue” por se destacarem pela inclusão das proteínas não-estruturais do vírus em sua formulação e pelo menor número de doses acompanhado com maior eficácia na proteção (Figura 1.7). Uma destas é a vacina TV003/TV005, também conhecida como TetraVax-DV, desenvolvida pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), nos Estados Unidos. Essa

vacina é composta por cepas de dengue atenuadas através da deleção de 30 nucleotídeos na região 3' não-traduzida (UTR) do genoma viral de cada um dos sorotipos. Os sorotipos 1, 3 e 4 foram construídos a partir do vírus completo de DENV, enquanto o sorotipo 2 é um vírus quimérico com esqueleto de DENV4 e as proteínas prM e E de DENV2 (Figura 1.7) (Kirkpatrick *et al.*, 2015). As formulações TV003 e TV005 possuem os mesmos componentes, entretanto a dose de cada sorotipo é de 10^3 PFUs (unidades formadoras de placa) na formulação TV003 e de 10^4 PFUs na formulação TV005 (Whitehead, 2016).

De acordo com os testes iniciais, a TV003 foi capaz de induzir taxas de soroconversão de 74%-92% contra os quatro sorotipos de DENV, enquanto a TV005 foi capaz de induzir uma taxa de 90% em adultos soronegativos para flavivírus. Uma segunda dose administrada de 6 a 12 meses depois foi capaz de induzir imunidade total nos voluntários (Whitehead *et al.*, 2016). Um teste clínico de fase III está em andamento em diversas cidades no Brasil em parceria com o Instituto Butantan, envolvendo aproximadamente 17 mil voluntários, incluindo crianças, adolescentes e adultos. Estudos paralelos demonstraram que a vacina é capaz de induzir resposta humoral robusta contra os quatro sorotipos bem como resposta celular, resultando em quase 100% de imunogenicidade em humanos infectados com o vírus da dengue (Angelo *et al.*, 2017; Weiskopf *et al.*, 2015a).

Outra vacina que está sendo testada em estudos clínicos de fase III é a vacina TDV/TAK 003 (também conhecida como DENVax), uma vacina de vírus recombinante/quimérico desenvolvida pela Takeda (Inviragen). A formulação tetravalente inclui o vírus DENV2 atenuado em células de rim de cachorro (PDK 53) e os vírus recombinantes DENV1, 3 e 4, que possuem os genes prM e E dos três sorotipos contidos no esqueleto de DENV2 atenuado (Osorio *et al.*, 2016) (Figura 1.7). Em estudos prévios, o vírus DENV2 atenuado em PDK 53 havia sido capaz de induzir altas taxas de soroconversão em voluntários soronegativos com a apresentação de sinais adversos mínimos após a vacinação (Vaughn *et al.*, 1996).

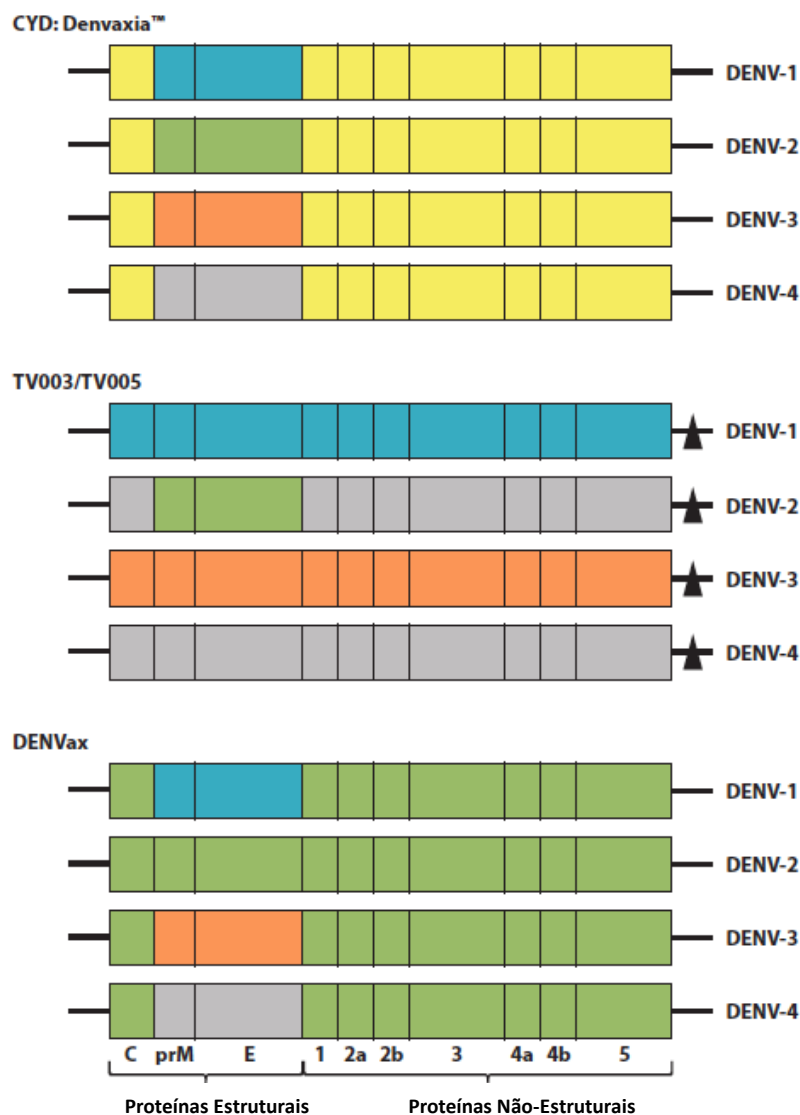


Figura 1.7: Representação esquemática de três vacinas vivo-atenuadas contra dengue. No topo está representada a vacina CYD-TDV ou Denvaxia™, no meio a vacina TV003/TV005 e embaixo a vacina DENVax. Em amarelo: vírus vacinal da febre amarela 17D; em azul: DENV1; em verde: DENV2; em vermelho: DENV3; em cinza: DENV4. Os triângulos representam as mutações na região 3' UTR na vacina TV003/TV005 (Adaptado de Prompetchara *et al.*, 2019).

Os resultados dos testes de fase I e II demonstraram que a DENVax é uma vacina imunogênica e segura tanto em crianças quanto adultos. Ela foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos do vírus, tanto em primatas não-humanos quanto humanos, sendo também capaz de induzir respostas cruzadas mediadas por células T que talvez sejam necessárias para proteção geral contra a febre da dengue (Osorio *et al.*, 2016; Saez-Llorens *et al.*, 2018) Um estudo clínico de fase III para testar a eficácia da vacina está em andamento, envolvendo aproximadamente 20 mil crianças na América Latina e Ásia, no esquema de vacinação de duas doses separadas por três meses entre elas (Swaminathan & Khanna, 2019).

Outra vacina de vírus vivo-atenuado é a TDENV-LAV, desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) nos Estados Unidos em colaboração com a GlaxoSmithKline (GSK). Sua formulação foi gerada por passagens seriadas dos quatro sorotipos de DENV em culturas de células: Os sorotipos 1, 2 e 4 foram atenuados por passagens em células primárias de rim de cachorro (PDK), enquanto o sorotipo 3 foi atenuado em células primárias de rim de macaco verde (Vero). Após estudos clínicos de fase I e II na Tailândia, a formulação 17 (TDENV-F17) foi escolhida para ser testada em estudos clínicos de fase II nos Estados Unidos por apresentar níveis satisfatórios de segurança e imunogenicidade. Entretanto, estudos de acompanhamento revelaram que a imunidade humoral induzida pela vacina não é duradoura. Os autores detectaram anticorpos neutralizantes restritos apenas aos sorotipos 2 e 4 (Gromowski *et al.*, 2018).

Outras formulações encontram-se atualmente na fase I de testes clínicos. Inclui-se nessa categoria a vacina de vírus inativado TDENV-PIV também desenvolvida pela parceria entre WRAIR e GSK. Essa vacina é composta dos quatro sorotipos de DENV propagados em células Vero e inativados com formalina. Dois ensaios clínicos foram realizados de forma a testar diferentes doses, com três diferentes tipos de adjuvante. Os resultados demonstraram que a formulação da vacina é segura e capaz de induzir resposta imunogênica, mas novos estudos são necessários (Diaz *et al.*, 2018).

O instituto WRAIR, dessa vez em parceria com o *Naval Medical Research Center* (NMRC) nos Estados Unidos, vem desenvolvendo uma vacina de DNA plasmidial denominada TVDV. A formulação dessa vacina é composta por uma mistura de quatro plasmídeos, cada um codificando os genes das proteínas prM e E de um dos sorotipos de DENV. Os resultados do ensaio clínico de fase I revelaram que a vacina TVDV induz predominantemente respostas de células T anti-DENVpositivas para a produção de interferon-gama (IFN- γ) em uma maneira dose-dependente. Entretanto, a vacina de DNA de DENV1 (DME100) foi avaliada em um estudo separado e baixos títulos de anticorpos neutralizantes foram observados nos indivíduos vacinados (Danko *et al.*, 2018). Posteriormente, uma nova formulação acrescida do adjuvante Vaxfectin® (uma composição de lipídeos catiônicos e neutros) foi testada, resultando no aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV1, DENV3 e DENV4 quando comparado com a administração da vacina sozinha.

A última vacina anti-dengue atualmente sendo testada em ensaios clínicos, mas cujos resultados ainda não foram divulgados, é a vacina de subunidade recombinante V180 desenvolvida pela Merck Sharpe & Dohme (MSD), e inicialmente desenvolvida pela Hawaii Biotech. Essa vacina compreende 80% da proteína E de DENV, truncada na região C-

terminal, expressa em células de inseto e complementada com adjuvante ISCOMATRIX (partículas compostas por colesterol, fosfolípidos e saponina) (Manoff *et al.*, 2015). As vacinas mencionadas nesta seção estão sumarizadas na tabela a seguir (Tabela 1.2).

Quadro 1.2: Lista de vacinas anti-dengue tetravalentes atualmente avaliadas em ensaios clínicos.

Vacina candidata	Fabricante	Tipo de vacina	Abordagem	Esquema de vacinação	Estágio clínico
CYD-TDV (Dengvaxia™)	Sanofi Pasteur	Vírus quimérico vivo-atenuado	Esqueleto de YFV expressando prM-E de DENV1/2/3/4	3 doses (0/6/12 meses) 9 a 45 anos	Licenciada
TetraVax-DV	NIAID / Butantan	Vírus quimérico vivo-atenuado	Genoma completo DENV1/3/4 + quimera DENV2/4 faltando 30 nucleotídeos na região 3'UTR	1 dose	Fase III
DENVax	US CDC / Inviragen / Takeda	Vírus quimérico vivo-atenuado	Esqueleto e genoma completo de DENV2 expressando prM e E de DENV1/3/4	2 doses (0/90 dias)	Fase III
TDENV-LAV	WRAIR e GSK	Vírus-vivo atenuado	DENV1/2/4 propagado em células PDK, DENV3 propagado em células Vero	2 doses (0/170 dias)	Fase II
DENV-PIV	WRAIR e GSK	Vírus inativado	DENV1/2/3/4 propagado em células Vero e inativado com formalina acrescido de adjuvante	2 doses (0/4 semanas)	Fase I
TVDV	WRAIR e NMRC	Vacina de DNA	plasmídeos que expressam prM-E de DENV1/2/3/4	3 doses (0/30/90 dias)	Fase I
V180	Hawaii Biotech Inc. e Merck	Vacina de Subunidade	80% da proteína E de DENV1/2/3/4	3 doses (0/1/2 meses)	Fase I

1.6 Vacinas de DNA

As vacinas de DNA consistem em plasmídeos de expressão em células eucarióticas contendo um ou mais genes que codificam proteínas imunogênicas. A proteína recombinante codificada pelo gene escolhido age como um antígeno para a estimulação da resposta imune do indivíduo vacinado, sendo capaz de induzir tanto a resposta imune celular quanto humoral. A expressão desta proteína é regulada por um promotor eucariótico ou viral, sendo também adicionados ao plasmídeo uma sequência de término de poliadenilação, um códon de parada da tradução e um gene marcador para seleção de células transformadas, como por exemplo genes de resistência a antibióticos (Koide *et al.*, 2000; Saade & Petrovsky, 2012; Khan, 2013).

A estratégia de imunização por meio de vacinas de DNA tem como a sua origem os estudos de Wolff e colaboradores, que, ao inocular plasmídeos contendo genes codificantes das proteínas cloranfenicol acetil transferase, luciferase e galactosidase em camundongos, observaram que a inoculação por via intramuscular levava as células musculares a sintetizarem tais proteínas recombinantes (Wolff *et al.*, 1990). Dois anos depois, outros pesquisadores observaram que a inoculação do gene codificante do hormônio do crescimento (GH) humano em camundongos era capaz de induzir anticorpos específicos contra essa proteína (Tang *et al.*, 1992). Ulmer e colaboradores também observaram a indução de uma resposta celular, ao inocular camundongos com um plasmídeo que codificava a nucleoproteína do vírus influenza. A vacina testada induziu respostas de células T CD8⁺ e anticorpos específicos contra a nucleoproteína viral, uma resposta protetora contra o desafio com o vírus (Ulmer *et al.*, 1993).

Desde então, diversos grupos têm adotado as vacinas de DNA como estratégia vacinal. As vacinas de DNA apresentam diversas vantagens em relação às vacinas convencionais: o preparo de plasmídeos é relativamente rápido e simples e apresentam bom custo-benefício quando comparadas com vacinas de proteínas recombinantes. Isso acontece porque a sua produção não precisa lidar com o enovelamento correto de proteínas, uma vez que a expressão destas é induzida dentro da célula eucariótica transfectada. Os DNA plasmidiais são estáveis e permitem fácil modificação de suas sequências. Além disso, o histórico de segurança dessas vacinas também apresenta vantagens consideráveis: a reação adversa mais comumente observada é uma reação inflamatória fraca a moderada associada à dor, vermelhidão e inchaço no local da injeção (Saade & Petrovsky, 2012; Tripathi & Shrivastava, 2018).

Uma preocupação em relação a este tipo de vacina se refere ao risco de integração do plasmídeo no genoma hospedeiro, que pode levar à inativação de genes de supressão tumoral e/ou a ativação de oncogenes, podendo também gerar instabilidade cromossômica (causando quebras e rearranjos). Entretanto, até agora, os dados experimentais mostraram que o percentual de integração plasmidial é negligenciável e menor que a taxa de mutação espontânea em genomas de mamíferos (Tripathi & Shrivastava, 2018).

Um problema associado às vacinas de DNA, entretanto, é a sua baixa imunogenicidade observada em primatas não humanos e humanos quando comparada aos testes com camundongos. No caso de vacinas de DNA, a imunogenicidade é um fator dependente de diversas variáveis, dentre as quais a captação de DNA por células imunologicamente relevantes, o nível de expressão e o tipo de antígeno, além da apresentação correta de antígeno que proporcione a montagem de uma resposta imune satisfatória. Existem algumas estratégias para aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA, incluindo formulações adicionadas de adjuvantes, o uso de sequências de ácidos nucleicos imunostimuladoras CpG e diferentes rotas de administração da vacina com eletroporação (Porter & Raviprakash, 2015).

Uma das vias mais comuns para imunização é a injeção que pode ser via diferentes tecidos, como muscular, derme ou mucosa. Após a injeção intramuscular, células musculares e monócitos são transfectados pelo DNA. Inicialmente se acreditava que o antígeno era apresentado via MHC classe I pelas células musculares, mas hoje em dia se sabe que a via principal de apresentação é pelo processo de “*cross-priming*”, onde o antígeno é capturado por células apresentadoras de antígenos (APC) (Liu *et al.*, 2011). Além disso, o antígeno também é apresentado via MHC classe II por APCs. Essas APCs se dirigem até um linfonodo regional onde são ativados linfócitos B e T CD4⁺ ou T CD8⁺.

1.6.1 Vacinas de DNA contra a dengue

Além da vacina de DNA TVDV que se encontra atualmente em ensaio clínico de fase I (citada na seção anterior), há diversas outras vacinas de DNA contra a dengue que estão em desenvolvimento. Kochel e colaboradores do *Naval Medical Research Center* (NMRC) foram um dos primeiros grupos a testar essa abordagem contra o vírus da dengue, focando no desenvolvimento de uma vacina de DNA monovalente contra dengue que continha o gene da proteína prM e 92% da sequência do gene da proteína E da cepa de Nova Guiné C de DENV2. Nesta construção, a porção transmembrana da proteína foi retirada de forma a promover a secreção da proteína E. Testes realizados em camundongos demonstraram que a

vacina foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, conferindo proteção contra um desafio intracerebral com DENV2 (Kochel *et al.*, 1997).

Esse mesmo grupo publicou outros estudos a partir desse modelo, testando diferentes plasmídeos e vias de inoculação. Além disso, demonstraram também a eficácia de uma vacina contendo as sequências inteiras dos genes da proteína prM e E de DENV1 em seu modelo murino (Raviprakash *et al.*, 2000). A partir do sucesso da vacina monovalente, eles desenvolveram vacinas baseadas nessa mesma construção para os sorotipos 2, 3 e 4, todas estas capazes de induzir respostas imunes em modelos animais, incluindo primatas não-humanos. Além disso, foram desenvolvidas formulações que expressam uma única proteína E contendo epítomos de todos os quatro sorotipos, de forma a atingir uma vacina tetravalente (Raviprakash *et al.*, 2006).

Outras vacinas de DNA contra dengue baseadas na proteína E foram construídas a partir daquela época (Azevedo *et al.*, 2011, 2013; De Paula *et al.*, 2008; Konishi *et al.*, 2000), bem como vacinas baseadas na proteína NS1 (Costa *et al.*, 2006; 2007; Wu *et al.*, 2003) e, mais recentemente, vacinas que combinam essas duas proteínas (Lu *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2011).

Novas tecnologias vêm sendo aplicadas de forma a aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA contra a dengue. Henrique e colaboradores testaram duas vacinas que contêm o gene da proteína NS1 de dengue 2, aDEC-NS1 e aDCIR2-NS1, que possuem como alvo específico células dendríticas. Essas construções foram capazes de proteger contra desafio viral via intracerebral (Henriques *et al.*, 2013). Outro estudo recente que envolve uma vacina de DNA baseada na proteína NS1 acrescida de microesferas de polímeros PLGA/PEG resultou em alta taxa de proteção contra a dengue (Huang *et al.*, 2013).

O Instituto NMRC também vem investigando novas abordagens para melhorar a imunogenicidade de suas vacinas de DNA, como o modelo da vacina DEN-1 que contém motivos CpG imuno-estimulatórios e um plasmídeo específico para primatas não-humanos que expressa o fator de crescimento GM-CSF (Raviprakash *et al.*, 2003). Além disso, este grupo também testou uma vacina de DNA na qual os genes das proteínas prM e da forma truncada da proteína E de DENV-2 foram fusionadas à proteína associada à membrana do lipossomo (LAMP), proporcionando maior expressão da molécula de MHC de classe II (Raviprakash *et al.*, 2001).

Novas tecnologias estão sendo testadas, como por exemplo, um plasmídeo codificante do domínio III da proteína E de dengue ligado ao domínio CH3 da cadeia pesada de imunoglobulina IgG (Poggianella *et al.*, 2015). Outra estratégia envolve uma vacina composta por um plasmídeo contendo o domínio III de E, administrado ao mesmo tempo que

um componente proteico constituído por múltiplas partículas do domínio III da proteína E apresentado no esqueleto da proteína E2 de *Geobacillus stearothermophilus* (McBurney *et al.*, 2016).

1.6.1.1 Vacinas de DNA desenvolvidas pelo nosso grupo

Nosso grupo vem desenvolvendo ao longo dos anos diversas vacinas de DNA baseadas em diferentes antígenos de DENV. Foram construídas algumas vacinas baseadas na proteína E, que contêm tanto o ectodomínio completo dessa proteína (domínios I, II e III, excluindo seu domínio transmembrana), como somente seu domínio III (Azevedo *et al.*, 2011, 2013). As proteínas não-estruturais também são alvo de interesse de estudo, levando à construção de vacinas de DNA baseadas na proteína NS3 inteira ou somente seus domínios funcionais (protease e helicase) (Costa *et al.*, 2011), bem como a construção de vacinas baseadas na proteína NS1 (Costa *et al.*, 2006, 2007).

A vacina pcTPANS1, objeto de estudo deste trabalho, é derivada do plasmídeo vetor comercial pcDNA3, no qual foi inserida a sequência do gene *ns1* de DENV2, fusionada à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA). O peptídeo sinal t-PA utilizado sinaliza a secreção da proteína recombinante para o meio extracelular. Os resultados indicaram que o pcTPANS1 é capaz de promover a correta expressão da proteína NS1 em células eucarióticas, sendo esta proteína encontrada no meio extracelular na sua forma dimérica em estudos *in vitro* com células transfectadas com este plasmídeo (Costa *et al.* 2006). Foi observado que camundongos BALB/c imunizados com duas doses dessa vacina tiveram seu pico de produção de anticorpos anti-NS1 duas semanas após a última imunização e que os níveis de anticorpos permaneceram estáveis por um período posterior de até 10 semanas. De fato, anticorpos anti-NS1 permaneceram presentes na circulação desses animais até 56 semanas depois da segunda dose. Além disso, quase 100% dos animais imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 sobreviveram a um desafio letal com DENV2, com apenas cerca de 10% destes apresentando sinais clínicos da infecção (Costa *et al.*, 2006).

Três outros plasmídeos contendo o gene *ns1* de DENV2 foram construídos: um contendo a sequência sinal natural da NS1 de DENV, que é codificada na porção 3' do gene da proteína do envelope (pcENS1), outro baseado nessa mesma construção mas contendo também a sequência que codifica a porção hidrofóbica N-terminal da proteína NS2A (pcENS1ANC) e outro baseado no plasmídeo pcTPANS1 mas que contém também a sequência N-terminal da proteína NS2A (pcTPANS1ANC). Este último plasmídeo não foi

capaz de promover a expressão e secreção da proteína NS1 em células transfectadas, provavelmente devido à presença de duas regiões muito hidrofóbicas na mesma proteína. Os plasmídeos pcENS1, pcTPANS1 e pcENS1ANC foram capazes de induzir uma resposta humoral em camundongos vacinados, mas os títulos de anticorpos gerados pelo plasmídeo pcENS1ANC foi seis vezes menor quando comparado com os outros plasmídeos. Esse fenômeno se deu provavelmente porque parte da proteína recombinante ficou retida na membrana plasmática de células transfectadas. Os plasmídeos pcENS1 e pcTPANS1 conferiram altas taxas de proteção em camundongos imunizados, mas o plasmídeo pcTPANS1 foi ligeiramente mais protetor em termos de sobrevivência e morbidade (Costa *et al.*, 2007).

Outros estudos do grupo vêm investigando os mecanismos imunes envolvidos na proteção contra dengue gerada pelo plasmídeo pcTPANS1. A vacina é capaz de induzir a ativação de células T CD8⁺ e T CD4⁺, bem como a produção de INF- γ por essas células. A depleção de células T CD4⁺ nos animais vacinados aboliu completamente a proteção após o desafio com uma dose letal de DENV2 (Pinto *et al.*, 2019). Por outro lado, a proteção contra DENV2 foi observada após a transferência adotiva de células T CD4⁺ juntamente com anticorpos anti-NS1 de camundongos vacinados para animais *naïves*, que foram, a seguir, desafiados com o vírus (Gonçalves *et al.*, 2015). Outros estudos revelaram que a vacina pcTPANS1 promove uma ativação sustentada de células T, bem como a migração e proliferação dessas células NS1-específicas para órgãos periféricos, como o fígado. Além disso, animais vacinados apresentaram menores níveis de INF- γ e IL-12p70 quando comparados com animais não-vacinados (Oliveira *et al.*, 2016a).

1.7 Modelos Animais Experimentais

O modelo animal ideal para o estudo de uma doença viral humana deve reproduzir o espectro de sintomas clínicos e mecanismos de patogênese observados durante o curso da infecção no hospedeiro humano. Idealmente, o modelo deve apresentar máxima permissibilidade para o patógeno de estudo, mínima resistência, sensibilidade às cepas patogênicas humanas, e possuir a mesma rota de infecção que aquela utilizada na condição humana (Krishnakumar *et al.*, 2019).

Primatas não humanos podem ser infectados pelo vírus da dengue (Clark *et al.*, 2013). Entretanto, a utilização desses animais, embora necessária para a aprovação de uma vacina para ensaios clínicos em humanos, possui utilidade limitada devido à ausência de sinais clínicos de uma infecção por DENV como observado no homem. Sendo assim, a maior parte

dos estudos com primatas não humanos se baseia no acompanhamento da viremia, avaliação da resposta de anticorpos e trombocitopenia após infecção secundária (Halstead *et al.*, 1973; Bente & Rico-Hesse, 2006).

Camundongos, por sua vez, são os modelos animais preferencialmente utilizados no estudo de doenças humanas devido a sua rápida disponibilidade, fácil criação e manejo. Outra vantagem desse modelo é a sua suscetibilidade à manipulação genética. Por outro lado, devido à especificidade e tropismo celular do vírus, bem como a ausência de receptores de entrada viral e de fatores específicos da resposta imune inata, modelos murinos apresentam suscetibilidade à infecção por DENV reduzida bem como ausência de sinais clínicos (Krishnakumar *et al.*, 2019). Cepas de camundongos imunocompetentes como C3H/He, AKR, A/J, BALB/c, B6, C57BL/6, quando desafiadas com DENV, são capazes de desenvolver viremia, trombocitopenia, anticorpos e algumas complicações neuropatológicas (Huang *et al.*, 2000; Paes *et al.*, 2005). A variabilidade e suscetibilidade ao DENV dependente da via de inoculação e da dose viral utilizada, levando em alguns casos ao óbito (Zellweger & Shresta, 2014).

Diferente de humanos, camundongos imunocompetentes são naturalmente resistentes à infecção por DENV, uma vez que o vírus não é capaz de provocar sinalização de interferon nesses animais (Coronel-Ruiz *et al.*, 2020). De forma a aumentar a eficiência da replicação viral no modelo murino, foram desenvolvidos camundongos deficientes em interferon. Nos anos 1990s, uma nova linhagem de camundongo foi criada através do cruzamento entre camundongos A129, que não possuem receptores de IFN tipo I, e camundongos G129, que não produzem INF- γ , criando assim a linhagem AG129 (Van den Broek *et al.*, 1995). Johnson e colaboradores foram os primeiros a testar a utilidade dos camundongos AG129 em testes de vacinas contra dengue, observando que esses camundongos eram capazes de sucumbir à infecção por vírus DENV2 adaptado a camundongos, enquanto a imunização os tornava capazes de sobreviver ao desafio viral. A transferência passiva de anticorpos policlonais anti-DENV também promoveu a sobrevivência desses animais (Johnson *et al.*, 1999).

Desde então, camundongos AG129 têm sido amplamente utilizados em estudos de vacina e medicamentos anti-dengue. Contudo, esse modelo apresenta diversas limitações, incluindo a dependência de linhagens de DENV que sejam capazes de se replicar apenas em animais imunocomprometidos, a ausência de sinais clínicos como febre e coceira visto em humanos, além da ausência de trombocitopenia e leucopenia quando inoculados subcutaneamente (Tan *et al.*, 2011) e não intraperitonealmente. (Sarathy *et al.*, 2015). Outros modelos camundongos *knockout* foram desenvolvidos, incluindo camundongos com

deleções individuais dos interferons e dos genes STAT (família de proteínas tradutoras de sinais e ativadores de transcrição) (Yauch *et al.*, 2009), camundongos *knockout* para fatores de regulatórios de interferon (IRF) 3 e 7 que são capazes de ser infectados através da picada de mosquitos, além de modelos de camundongos com deleção para o receptor de quimiocina CCR5 (Carlin *et al.*, 2017, Marques *et al.*, 2015). Tais estudos realizados em camundongos *knockout* demonstraram o envolvimento de diversas vias de sinalização celular na infecção por DENV. Entretanto, estes modelos apresentam algumas limitações, principalmente em testes com vacinas, pois a resposta imune induzida é comprometida.

Outros modelos de infecção por DENV atualmente utilizados envolvem o uso de camundongos geneticamente modificados/transgênicos. Estes incluem camundongos C57BL/6 que expressam o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) humano, utilizados no estudo das complicações por infecção por DENV que causam encefalite (Jhan *et al.*, 2018). Outro exemplo são os camundongos que não possuem os receptores para IFN- α e β e que expressam alelos de MHC humano (camundongos IFN- α / β R-/-Tg), como os HLA-A*201, A*0101, B*0701 e DRB1*0101 utilizados para investigar as respostas de células T contra DENV (Yauch *et al.*, 2009, 2010). Uma estratégia é também a utilização de modelos murinos humanizados. Camundongos NOD/SCID (diabético não-obeso/portador de síndrome imunodeficiência combinada severa) transplantados com células progenitoras hematopoéticas de sangue do cordão umbilical humano (CD34+), quando infectados, simulam uma infecção nas condições naturais em humanos, apresentando sinais clínicos clássicos de dengue como febre, coceira e trombocitopenia (Bente *et al.*, 2005). Outros exemplos são camundongos RAG2-/- γ c-/- transplantados de células CD34+ e camundongos NOD-SCID IL2R α (Kuruvilla *et al.*, 2007). O problema com esses modelos, entretanto, é que esses camundongos humanizados desenvolvem predominantemente uma resposta IgM contra infecções por dengue. Apenas alguns conseguem montar uma resposta IgG porque seu mecanismo imune de mudança de classe de imunoglobulinas é comprometido (Kuruvilla *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2011). Esses modelos apresentam outras desvantagens: certas populações celulares são escassas em seu organismo, como células B funcionais, e o transplante de células necessariamente impõe uma variável que depende da eficiência do enxerto (Coronel-Ruiz *et al.*, 2020).

Um modelo experimental tradicionalmente utilizado nos estudos de flavivírus é a injeção intracerebral de linhagens virais neuroadaptadas através de passagens seriadas no cérebro de camundongos, resultando em um vírus de neurovirulência selecionada. Esses vírus são capazes de replicar localmente, podendo ocasionar sinais clínicos, encefalite e morte em camundongos imunocompetentes (Sabin, 1952). Essas características permitem a

utilização desse modelo como uma estratégia para avaliação de eficácia e segurança de vacinas em diferentes linhagens de camundongos, incluindo o Swiss albino, BALB/c, Swiss CD1 e BALB/CJ. Algumas desvantagens desses modelos incluem a dificuldade de extrapolação dos resultados para uma realidade de infecção humana, a via de infecção que não ocorre naturalmente e o uso de linhagens neuroadaptadas, que não circulam na população humana (Bente & Rico-Hesse, 2006; Coronel-Ruiz *et al.*, 2020). Por outro lado, apesar dos sinais clínicos apresentados pelos camundongos inoculados não serem os mesmos que os observados em humanos, existem evidências do comprometimento neuronal em alguns casos de dengue (Soares *et al.*, 2011), sem contar que esse modelo permite a avaliação de vacinas em camundongos imunocompetentes.

Os trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa utilizam o modelo experimental de infecção pela via intracerebral para a realização do desafio viral. Além das vantagens deste modelo citadas acima, nosso grupo demonstrou que a inoculação por via intracerebral é capaz de gerar um efeito sistêmico, com a detecção de partículas virais infecciosas na corrente sanguínea e replicação do vírus em órgãos periféricos como o fígado (Oliveira *et al.*, 2016b).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi a investigação da resposta imune celular gerada pela vacina de DNA pTPANS1 em camundongos BALB/c. O trabalho foi desenvolvido através da identificação de peptídeos imunogênicos presentes na proteína NS1 de DENV2 reconhecidos por linfócitos T, bem como a caracterização do perfil funcional das células que respondem a esses peptídeos, antes e após o desafio de DENV2 inoculado por via intracerebral.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Esse projeto possui como objetivo caracterizar a resposta imune celular gerada por uma vacina de DNA contendo o gene NS1 de DENV2, pcTPANS1, e avaliar seu papel na proteção conferida por essa vacina em camundongos BALB/c.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar epítomos imunogênicos presentes na proteína NS1 de DENV2 que sejam reconhecidos por linfócitos T de camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pcTPANS1, através da produção de IFN- γ em ensaio de ELISPOT utilizando uma biblioteca de peptídeos que englobam toda a proteína.
- Avaliar possíveis diferenças entre a resposta imune celular gerada pela vacina pcTPANS1 antes e após o desafio com DENV2, ou somente após a infecção viral, frente à biblioteca de peptídeos da proteína NS1.
- Caracterizar as populações de células T que respondem aos peptídeos identificados.
- Avaliar a ativação de células T citotóxicas frente aos peptídeos selecionados.
- Identificar epítomos imunogênicos reconhecidos por células T de camundongos C57BL/6 imunizados com a vacina pcTPANS1 e comparar com os dados obtidos com BALB/c.

3. Material e Métodos

3.1 Produção das Vacinas de DNA

Foi utilizada uma vacina de DNA, pcTPANS1, previamente construída pelo nosso grupo (Costa *et al.*, 2006). Este plasmídeo é derivado do vetor comercial pcDNA3 (Invitrogen) e contém a sequência que codifica a proteína NS1 do vírus da dengue do tipo 2 (cepa Nova Guiné) fusionada à sequência do peptídeo sinal do ativador de tecido de plasminogênio humano (t-PA). Além da sequência do gene *ns1*, controlada pela região promotora do citomegalovírus humano (CMV). Este plasmídeo também contém a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH), uma origem de replicação em células procarióticas (ColE1) e o gene que confere resistência a ampicilina (Figura 3.1). Como controle, utilizamos o plasmídeo pcTPA, também derivado do vetor comercial pcDNA3, que contém apenas a sequência do peptídeo sinal t-PA.

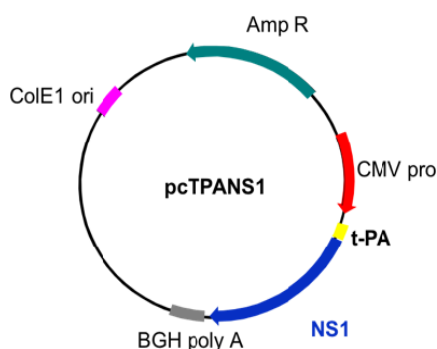


Figura 3.1: Esquema representativo do plasmídeo pcTPANS1. O plasmídeo é derivado do vetor comercial pcDNA3 e contém a sequência codificante da proteína NS1 do sorotipo 2 d o vírus da dengue. ColE1 ori – origem de replicação em *E. coli*; CMV pro – promotor derivado do citomegalovírus humano; Amp R – gene que confere resistência à ampicilina; BGH poly A – sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino; t-PA – sequência derivada do peptídeo sinal do ativador de plasminogênio humano.

Para a produção de grandes quantidades de DNA plasmidial, bactérias *Escherichia coli* DH5- α previamente transformadas com os plasmídeos pcTPANS1 e pcTPA foram crescidas em meio LB (*Luri Broth*) contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C e mantidas a 120 rpm em agitação durante a noite. No dia seguinte, 25 mL destas culturas foram adicionados a 1 L de meio TB (*Terrific Broth*) (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 mL de glicerol, 2,3 g de KH_2PO_4 , 12,5 g de K_2HPO_4) contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e mantidas novamente a 37°C, sob agitação, durante a noite.

O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e purificado em colunas de troca iônica, através da utilização do kit QIAGEN EndofreePlasmid Giga (Qiagen), segundo as instruções do fabricante, e ressuspensão em água ultrapura (Invitrogen) livre de endonucleases. O DNA foi quantificado no aparelho NanoPhotometer® P-Class (Implen)

através de leitura no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, as concentrações e a integridade dos plasmídeos foram confirmadas por digestões com as enzimas de restrição Eco RV/Xho I, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen) e eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (4,84 g de Tris, 1,142 mL de ácido acético, 2 mL de EDTA 0,5 M para 1 L, pH 8,0), corado com Nancy-520 e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). O gene *ns1* presente no pcTPANS1 foi então sequenciado pela Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz (RPT01A) e os plasmídeos foram armazenados a -20°C até o momento de uso.

3.2 Imunização dos Animais e Desafio com DENV2

Todos os experimentos com animais pertencentes a esse estudo foram realizados segundo os princípios éticos determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (CEUA nº: L-039/2015 e L-022/2019). Os animais utilizados neste estudo foram provenientes do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Campinas, SP.

Camundongos BALB/c ou C57BL/6 machos *specific-pathogen free* (SPF), de 4 a 6 semanas de idade, foram inoculados por via intramuscular (i.m.) nos quadríceps posteriores, com duas doses da vacina de DNA pcTPANS1 ou do plasmídeo controle pcTPA, mantendo-se um intervalo de duas semanas entre as doses. Cada dose consistiu de 100 µg de DNA em 100 µL de PBS (8,0 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄ em 1L, pH 7,4), sendo inoculados 50 µg de DNA por pata do animal, com o uso de seringas BD Ultra-Fine II 0,5 mL, agulha 8 mm x 0,3 mm (BD/Pharmigen).

Duas semanas após a segunda dose dos plasmídeos, camundongos BALB/c foram eutanasiados para a coleta de esplenócitos para a realização de experimentos ELISPOT e Marcação Intracelular de Citocinas (“*Intracellular Cytokine Staining*”, ICS), ou desafiados por via intracerebral (i.c.) com uma dose letal de DENV2 NGC neuroadaptado a camundongos que corresponde aproximadamente a 40 LD₅₀ ou 3,5 log₁₀ PFU/mL. Os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com aproximadamente 100 µL de uma solução composta de 75 µL/mL de cloridrato de cetamina 10% (Konig), 200 µL/mL de cloridrato de xilazina 10% (Konig) e 725 µL/mL de solução salina estéril. Posteriormente, cada animal foi inoculado com 30 µL de vírus diluído em meio 199 com sais de Earle

(Invitrogen) adicionado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen) através do uso de seringas BD Ultra-Fine II 0,3 mL, agulha 8 mm x 0,3 mm (BD/Pharmingen).

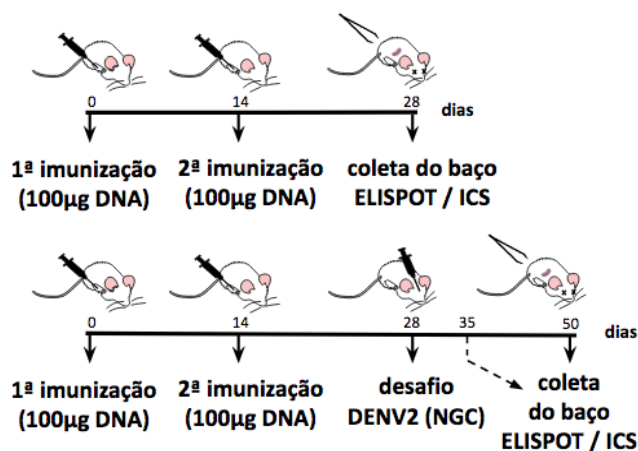


Figura 3.2: Representação esquemática do protocolo de imunização e desafio viral. Camundongos BALB/c ou C57BL/6 de 4 semanas de idade foram imunizados com duas doses do pcTPANS1 ou do pcTPA por via intramuscular, espaçadas por duas semanas entre elas. Duas semanas após a segunda imunização, foi realizada a coleta dos baços e isolamento de esplenócitos para a realização de ensaios ELISPOT ou ICS. Em outro grupo experimental, duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com uma dose letal de DENV2 (cepa NGC), correspondente a 40 LD₅₀ e 3,5 log₁₀ PFU/mL, e a coleta de baços foi realizada após 7 ou 21 dias para a realização de ensaios ELISPOT ou ICS.

Conforme o experimento, 7 ou 21 dias após o desafio viral os animais foram anestesiados e eutanasiados por punção cardíaca para a realização de experimentos ELISPOT e ICS (Figura 3.2). Para a eutanásia dos animais foi utilizada duas vezes a dose anestésica descrita acima.

3.3 Biblioteca de Peptídeos

Foram sintetizados 86 peptídeos contidos na sequência da proteína NS1 de DENV2 cepa Nova Guiné, cada um contendo 15 aminoácidos de comprimento (Mimotopes Pty Ltd ABN). Cada peptídeo foi sintetizado adicionando-se os 4 aminoácidos seguintes na sequência da proteína NS1, com sobreposição de 11 aminoácidos da sequência anterior (Figura 3.3). Esses peptídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura (Invitrogen) em uma concentração final de 2 µg/µL e pureza média de 80%, e depois estocados a -20°C até o uso.

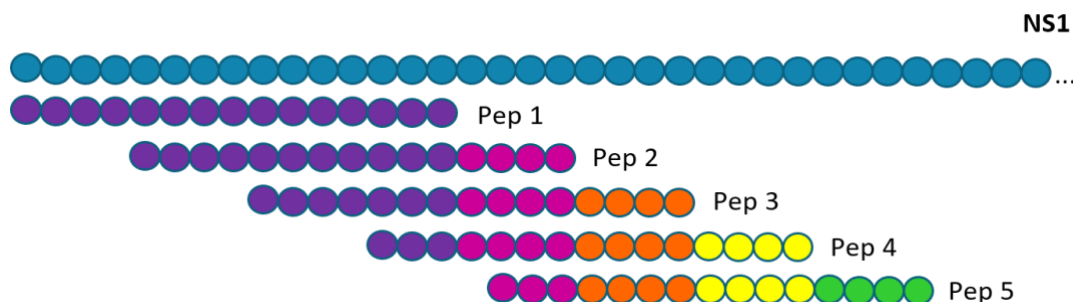


Figura 3.3: Representação esquemática da biblioteca de peptídeos NS1. Cada peptídeo é composto por 15 aminoácidos, apresentando uma sobreposição de 11 aminoácidos com o peptídeo anterior e acrescentando os 4 próximos aminoácidos na sequência da proteína NS1. Representado no esquema está a proteína NS1 (em azul), composta por aminoácidos representados como círculos.

Primeiramente os testes foram realizados utilizando os peptídeos agrupados em *pools* de 8 a 10 peptídeos, totalizando-se 9 *pools* (descritos na Tabela 3.1). Peptídeos que foram identificados como promissores, de acordo com os testes iniciais de produção de IFN- γ por ELISPOT, foram sintetizados a uma pureza de 90% ou maior (GenScript) e ressuspensos sob as mesmas condições para uso.

Tabela 3.1: Sequência e localização dos peptídeos de NS1 utilizados

N01	DSGCVVSWKNKELKC	Pool 1	N31	AKMLSTESHNQTFLI	Pool 4
N02	VVSWKNKELKCGSGI		N32	STESHNQTFLIDGPE	
N03	KNKELKCGSGIFITD		N33	HNQTFLIDGPETAEC	
N04	LKCGSGIFITDNVHT		N34	FLIDGPETAACPNTN	
N05	SGIFITDNVHTWTEQ		N35	GPETAACPNTNRAWN	
N06	ITDNVHTWTEQYKFQ		N36	AACPNTNRAWNSLEV	
N07	VHTWTEQYKFPESP		N37	NTNRAWNSLEVEDYG	
N08	TEQYKFPESP SKLA		N38	AWNSLEVEDYGFGVVF	
N09	KFPESP SKLASAIQ		N39	LEVEDYGFGVFTTNI	
N10	ESPSKLASAIQKAHE		N40	DYGFVFTTNIWLKL	
N11	KLASAIQKAHEEGIC	Pool 2	N41	GVFTTNIWLKLREKQ	Pool 5
N12	AIQKAHEEGICGIRS		N42	TNIWLKLREKQDVFC	
N13	AHEEGICGIRSVTRL		N43	LKLREKQDVFCDSKL	
N14	GICGIRSVTRLENLM		N44	EKQDVFCDSKLMSAA	
N15	IRSVTRLENLMWKQI		N45	VFCDSKLMSAAIKDN	
N16	TRLENLMWKQITPEL		N46	SKLMSAAIKDNRAVH	
N17	NLMWKQITPELNHIL		N47	SAAIKDNRAVHADMG	
N18	KQITPELNHILSENE		N48	KDNRAVHADMGYWIE	
N19	PELNHILSENEVKLT		N49	AVHADMGYWIESALN	
N20	HILSENEVKLTIMTG		N50	DMGYWIESALNDTWK	
N21	ENEVKLTIMTGDIKG	Pool 3	N51	WIESALNDTWKIEKA	Pool 6
N22	KLTIMTGDIKGIMQA		N52	ALNDTWKIEKASFIE	
N23	MTGDIKGIMQAGKRS		N53	TWKIEKASFIEVKSC	
N24	IKGIMQAGKRS LQPQ		N54	EKASFIEVKSCHWPK	
N25	MQAGKRS LQPQ PTEL		N55	FIEVKSCHWPKSHTL	
N26	KRS LQPQ PTEL KY SW		N56	KSCHWPKSHTLWSNG	
N27	QPQ PTEL KY SW KT WG		N57	WPKSHTLWSNGVLES	
N28	TELKY SW KT WG KAKM		N58	HTLWSNGVLESEMII	
N29	YSWKTWG KAKMLSTE		N59	SNGVLESEMIIPKNF	
N30	TWG KAKMLSTESHNQ		N60	LESEMIIPKNFAGPV	

N61	MIIPKNFAGPVSQHN	Pool 7
N62	KNFAGPVSQHNYPG	
N63	GPVSQHNYPGYHTQ	
N64	QHNYPGYHTQTAGP	
N65	RPGYHTQTAGPWHLG	
N66	HTQTAGPWHLGKLEM	
N67	AGPWHLGKLEMDDFD	
N68	HLGKLEMDDFDCEGT	
N70	FDCEGTTVVVTEDC	
N71	EGTTVVVTEDCGNRG	
N72	VVVTEDCGNRGPCLR	
N73	EDCGNRGPCLRTTTA	
N74	NRGPCLRTTTASGKL	
N75	SLRTTTASGKLITW	
N76	TTASGKLITWCCRS	
N77	GKLITWCCRSCTLP	
N78	TEWCCRSCTLPPLRY	
N79	CRSCTLPPLRYRGED	
N80	TLPLRYRGEDGCWY	
N81	LRRYRGEDGCWYMEI	
N82	GEDGCWYMEIRPLK	Pool 9
N83	CWYMEIRPLKEKEE	
N84	MEIRPLKEKEENLVN	
N85	PLKEKEENLVNSLVT	
N86	KEENLVNSLVT	
N69.1*	LEMDFDFCEGTTVVV	
N69.2*	LEMDFDFCEGTTVVV	
N69.3*	LEMDFDFCEGTTVVV	

(*) Peptídeo N69 foi produzido com diferentes graus de pureza.

3.4 Isolamento de Esplenócitos

Para a realização de experimentos ELISPOT, ICS e Citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, os esplenócitos coletados de camundongos inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não com DENV2, e de animais controle foram centrifugados a 600 x g por 10 minutos (Sorvall ST16, Thermo Fisher Scientific) e ressuspensos em 4 mL do reagente BD PharmLyse™ (BD Biosciences) na diluição de 1:10, de acordo com as instruções do fabricante. Transcorridos 10 minutos do tempo para a lise de hemácias, as células foram lavadas com PBS estéril e centrifugadas novamente a 600 x g por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 1% de L-glutamina 200 nM (Sigma), acrescentado de sulfato de gentamicina (40 ng/mL, Sigma). A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de Trypan. Os esplenócitos foram ressuspensos em uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL

(5×10^5 células/poço) para a realização dos testes de INF- γ ELISPOT e 1×10^7 células/mL (2×10^6 células/poço) para a realização de testes de ICS. Em ambos os testes, os esplenócitos foram adicionados a placas de 96 poços em uma suspensão celular de 100 μ L por poço.

3.5 Ensaio de produção de Interferon-gamma ELISPOT (“*Enzyme-linked ImmunoSpot Assay*”)

Esplenócitos de camundongos BALB/c ou C57BL/6 inoculados com pcTPA ou pcTPANS1 foram isolados duas semanas após a última imunização sem desafio viral, e 7 ou 21 dias após desafio com DENV2 para a avaliação da produção de IFN- γ por ELISPOT (kit BD Biosciences). Primeiramente os ensaios foram realizados testando os peptídeos em *pools*, com as células dos animais de cada grupo também agrupadas em *pool*. Posteriormente, a partir da seleção dos *pools* positivos, cada peptídeo pertencente a esses *pools* foi testado individualmente em novos ensaios de ELISPOT, com esplenócitos de cada animal coletados e analisados também individualmente.

As placas de ELISPOT de 96 poços (Millipore, Bedford) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ de captura (5 μ g/mL) e guardadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, essas placas foram bloqueadas com meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina 200 nM por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, 5×10^5 esplenócitos isolados de animais *naïves* e animais inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não com DENV2, foram adicionados às placas em uma suspensão celular em meio RPMI-1640 enriquecido. Concomitantemente, foi adicionada uma concentração de 10 μ g/mL de peptídeos NS1 por poço (em *pool* ou individualmente), em triplicata. Células não-estimuladas e estimuladas com 10 μ g/mL de concanavalina A (Con A) também foram adicionadas às placas como controle negativo e positivo, respectivamente.

Após um período de estimulação de 18 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, as células foram descartadas e as placas foram lavadas duas vezes com água MilliQ, seguido por três lavagens com PBS-Tween 0,05% (200 μ L/poço). Os poços foram incubados com 2 μ g/mL de anticorpo biotilado anti-IFN- γ de detecção por 2 horas à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as placas foram lavadas mais três vezes com PBS-Tween 0,05% e posteriormente incubadas com estreptavidina (HRP) conjugada à peroxidase (diluição 1:100) por 1 hora à temperatura ambiente. Para finalizar, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween e duas vezes com PBS e reveladas através da adição do substrato AEC (BD

Biosciences) à temperatura ambiente. A reação foi interrompida a partir de adição de água Milli-Q.

Após a revelação, as placas foram lidas em um Immunospotreader (Ambriex, Cellular Technology Ltd) através da utilização do programa Immunospot Versão 3, na Plataforma Multiusuário de ELISPOT da Fiocruz (RPT08C). Nos primeiros testes a positividade foi determinada como ≥ 5 IFN- γ SFC (“spot-forming cells”, ou células formadoras de spot) por 5×10^5 células e quando maior que o controle. Também foi considerada a adjacência dos peptídeos, de forma a selecionar diferentes regiões imunogênicas. Os testes seguintes foram realizados utilizando-se células de animais individuais e a positividade foi determinada por teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney comparando grupos vacinado e controle, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

3.6 Ensaios de Marcação Intracelular de Citocinas (“*Intracellular Cytokine Staining*”, ICS)

Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 (n=5) conforme descrito no item 3.4, infectados ou não com DENV2, foram testados quanto à produção de IFN- γ e TNF- α através da marcação de citocinas intracelulares (ICS). Os esplenócitos foram adicionados a placas de 96 poços de fundo em U (CorningCostar) e incubados com os peptídeos de NS1 previamente selecionados, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ por 6 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Cada placa primeiramente recebeu 2×10^6 células em uma suspensão de 100 μL /poço em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina 200 nM e sulfato de gentamicina (40 ng/mL), e posteriormente uma suspensão de peptídeos de 2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /poço. Após um período de estimulação inicial de 1 hora e 30 minutos, foi adicionada Brefeldina A (GolgiPlug BD Biosciences) em uma suspensão de 50 μL /poço correspondente a 2 μL de Brefeldina A por poço (40 $\mu\text{g/mL}$). As placas foram incubadas novamente por mais um período de 4 horas e 30 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Decorrido esse tempo, as placas foram recolhidas e centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 4°C. Os receptores Fc foram bloqueados com PBS acrescentado de 10% de soro murino (não imunizado) por 30 minutos, em banho de gelo (50 μL /poço). Posteriormente, as placas foram novamente centrifugadas e as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4%

por 40 minutos em gelo e guardadas até o dia seguinte em geladeira (4°C). A marcação extracelular foi realizada através dos anticorpos anti-CD3 PE (clone 145-2C11, BD Biosciences) (diluição 1:40), anti-CD4 PerCP (diluição 1:100) ou APC (clone RM4-5, BD Biosciences) (diluição 1:200) e anti-CD8 FITC (diluição 1:50) ou PerCP (clone 33-6.7, BD Biosciences) (diluição 1:50) em 20 µL/poço, diluídos em tampão FACS (8,0 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, 2 mM EDTA, 0,5% BSA). As placas foram incubadas com os anticorpos por 40 minutos no escuro em banho de gelo.

As células foram posteriormente permeabilizadas com o kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). Primeiramente foi adicionado o reagente Cytotfix (100 µL/poço), incubando-se a reação no escuro por 20 minutos em banho de gelo. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados duas vezes com o reagente Cytoperm (200 µL/poço) diluído dez vezes em água Milli-Q. A marcação intracelular foi realizada com anticorpos anti-IFN- γ AlexaFluor 488 (diluição 1:50) (clone XMG12, BioLegend) e anti-TNF- α AlexaFluor 647 (diluição 1:50) (clone MP6-XT22, BD Biosciences) em quantidade total de 20 µL/poço, diluídos no reagente Cytoperm. O tempo de incubação com os anticorpos foi de 1 hora no escuro em banho de gelo. Após esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS (200 µL/poço) e transferidas para tubos de leitura em citômetro.

As amostras foram lidas em um FACSCalibur (BD Biosciences) no laboratório de Imunofarmacologia (IOC/Fiocruz) através do auxílio da Dra Adriana Vallochi e analisadas utilizando o software FlowJo v.10 (TreeStar). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas através da realização de teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney comparando grupos vacinado e controle, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

3.7 Teste de Citotoxicidade *in vivo*

Esplenócitos de camundongos BALB/c *naïves*, isolados conforme descrito no item 3.4, foram marcados com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (CellTrace, Invitrogen), restituído em DMSO, em baixa CSFELow (50 µM) ou alta CSFEHigh (500 µM) concentração, por 15 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Para cada 2x10⁷ células foram adicionados 10 µL de CFSE em 1 mL de PBS estéril.

As células marcadas com CSFEHigh foram incubadas posteriormente com 2 µg de peptídeos de NS1 por 40 minutos em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal

bovino e 1% de L-glutamina 200 nM, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. No primeiro experimento foram utilizados os peptídeos da nossa biblioteca previamente selecionados (N14, N17, N35, N67), e nos experimentos seguintes adicionamos o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL₂₇₃também contido na proteína NS1, previamente descrito (Gao *et al.*, 2008). As células marcadas com CFSE_{Low} foram incubadas apenas com meio de cultura.

Células com ambas concentrações de CFSE foram transferidas por via intraorbital para camundongos BALB/c inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não 72 horas antes com DENV2, em uma proporção de 1x10⁷ células CFSE_{High}/100µL de meio RPMI-1640 e 1x10⁷ células CFSE_{Low}/100µL de meio RPMI-1640 conforme protocolo previamente estabelecido no nosso laboratório (Gonçalves *et al.*, 2015). Uma alíquota da mistura celular CFSE_{High}/CFSE_{Low} foi coletada para análise por citometria de fluxo do tempo 0 pré-transferência. Os camundongos receptores foram eutanasiados 20 horas após a transferência de células e os seus esplenócitos isolados conforme descrito no item 3.4 para análise por citometria de fluxo. Foi utilizado o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences) da Plataforma de Citometria de Fluxo - Análise Multiparamétrica do Instituto Oswaldo Cruz, bem como o aparelho CytoFLEX (BeckmanCoulter) da mesma plataforma para a leitura das amostras. O esquema experimental para análise de citototoxicidade *in vivo* está descrito na figura 3.4.

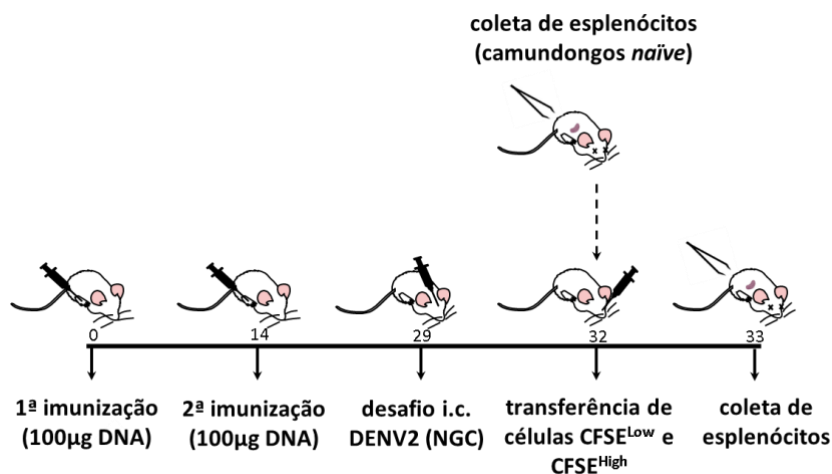


Figura 3.4: Representação esquemática do protocolo do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Camundongos BALB/c de 4 semanas de idade foram imunizados com duas doses da vacina pcTPANS1 por via intramuscular, espaçadas por duas semanas entre elas. Duas semanas após a segunda imunização, os camundongos foram desafiados com uma dose letal de DENV2 correspondente a 40 LD₅₀, e 72 horas após o desafio esses animais receberam uma mistura de esplenócitos marcados com baixas e altas concentrações de CFSE (Low e High, respectivamente). Os esplenócitos marcados com altas concentrações de CFSE foram pulsados com diferentes peptídeos. A coleta dos baços foi realizada 20 horas após a transferência de células para análise do percentual de células CFSE_{Low} e CFSE_{High} por citometria de fluxo.

Os dados obtidos foram analisados através dos softwares Summit versão 4.3 (Cytomation, US) e CytExpert (BeckmanCoulter) para a determinação das porcentagens de lise das células marcadas com CFSE_{High} em relação à população marcada com CFSE_{Low}. O valor da porcentagem de lise celular foi determinado pela fórmula: lise celular (%) = $(1 - \text{CFSE}_{\text{high}}/\text{CFSE}_{\text{low}}) \times 100$. Os valores obtidos em cada grupo foram avaliados por teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.

3.8 Teste de Citotoxicidade *in vitro*

Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c inoculados com pcTPA (n=5) ou imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 (n=5) foram isolados conforme descrito no item 3.4, e testados quanto à exposição de CD107a através de marcação com anticorpos. Uma quantidade de 2×10^6 esplenócitos/poço foi adicionada a placas de 96 poços de fundo em U, e as células foram incubadas com meio ou com os peptídeos N67 e ₂₆₅AGPWHLGKL₂₇₃ na concentração de 10 µg/mL por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Semelhante ao descrito no item 3.6, cada placa recebeu 2×10^6 células em uma suspensão de 100 µL/poço em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina 200 nM e sulfato de gentamicina (40 ng/mL), juntamente a suspensão de 2 µg de peptídeo/50 µL/poço. As placas foram incubadas um período de 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Também semelhante ao descrito no item 3.6, decorrido esse tempo as placas foram recolhidas e centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 4°C. Os receptores Fc foram bloqueados com PBS acrescentado de 10% de soro murino (não imunizado) por 30 minutos, em banho de gelo (50 µL/poço), e então as placas foram centrifugadas e as culturas fixadas com paraformaldeído 4% por 40 minutos em gelo, guardadas até o dia seguinte em geladeira (4°C). A marcação extracelular foi realizada através dos anticorpos anti-CD3 PE CF594 (clone H57-597, BD Biosciences)(diluição 1:400), anti-CD4 PerCP (clone RM4-5, BD Biosciences)(diluição 1:50), anti-CD8a APC-CyTM7 (clone 53-6.7, BD Biosciences)(diluição 1:400) e anti-CD107a PE (clone 1 D4B, BD Biosciences)(diluição 1:100) em um volume total de 20 µL/poço, diluídos em tampão FACS. As placas foram incubadas com esses anticorpos por 40 minutos no escuro em banho de gelo, período após o qual, as placas foram

lavadas duas vezes com tampão FACS (200 μ L/poço) e transferidas para tubos de leitura em citômetro.

As amostras foram lidas no aparelho CytoFLEX S (Beckman Coulter) da Plataforma de Citometria de Fluxo — Análise Multiparamétrica do Instituto Oswaldo Cruz, e analisadas utilizando o software FlowJo v.10. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas através da realização de teste de Análise de Variância 2 fatores (“*Two-way ANOVA*”), seguida do teste de Tukey, comparando grupos vacinado e controle e os diferentes tipos de estímulo. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 8.0.

3.9 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 8.0 (La Jolla, EUA), onde foram considerados estatisticamente significativos testes cujos valores de $p < 0,05$. Os ensaios de ELISPOT e ICS foram avaliados por teste não-paramétrico Mann-Whitney two-tailed, enquanto o ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi avaliado pelo teste *Two-way ANOVA* seguido por teste de Tukey.

4. Resultados

4.1 Identificação de peptídeos imunogênicos da proteína NS1 reconhecidos por células T com produção de IFN- γ em camundongos vacinados com pcTPANS1

Para avaliar a resposta imune celular conferida pela vacina pcTPANS1, camundongos BALB/c foram inoculados por via intramuscular com duas doses deste plasmídeo ou com o plasmídeo controle pcTPA. Duas semanas após a segunda dose de DNA, realizamos os ensaios iniciais de ELISPOT para a identificação dos peptídeos contidos na proteína NS1 capazes de estimular a produção de IFN- γ . Para esse propósito, foi utilizada uma biblioteca de peptídeos compostos por 15 aminoácidos, com 4 aminoácidos de sobreposição entre eles, cobrindo toda a extensão da proteína NS1 de DENV2 (cepa NGC).

Os primeiros testes de ELISPOT para detecção de IFN- γ foram realizados utilizando esplenócitos coletados de animais imunizados com pcTPANS1 ou inoculados com o plasmídeo controle pcTPA e agrupados em *pool* (n=3). Os peptídeos testados também foram agrupados, em 9 *pools* totais, compostos de 8 a 10 peptídeos. Realizamos uma análise não-excludente de seleção, em que a positividade foi determinada como uma magnitude de resposta maior ou igual a 5 células formadoras de *spot* (SFC) por 5×10^5 células e maior do que a observada nas células controle. Células incubadas com Concanavalina A ou meio RPMI foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Nossos testes revelaram como positivos os *pools* 2, 5, 6 e 7 (Figura 4.1A). A partir desses resultados, avaliamos a resposta de IFN- γ dos esplenócitos de camundongos imunizados com pcTPANS1 frente a cada um dos peptídeos contidos nesses quatro *pools*. Os peptídeos N17, N46, bem como a região composta pelos peptídeos N66-67, se mostraram positivos quando comparadas as respostas entre as células do grupo controle pcTPA e as células isoladas de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 (Figura 4.1B).

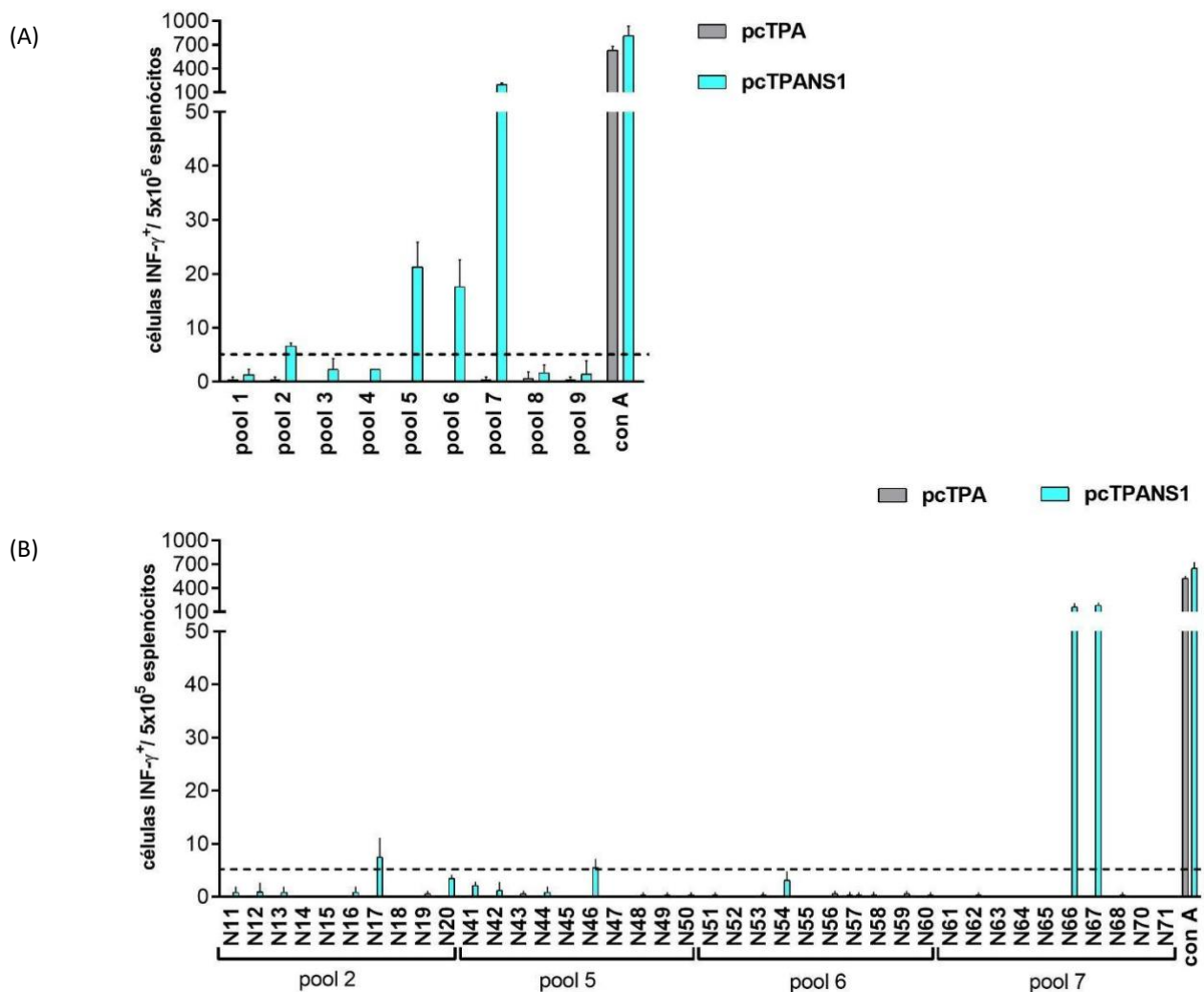


Figura 4.1: Produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com peptídeos de NS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c ($n=3$, *pool*) imunizados com duas doses de pcTPANS1 foram incubados com peptídeos de NS1 por 18 horas, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ELISPOT. Os peptídeos foram analisados em pools (A) e selecionados para avaliação individual (B). Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA foram usadas como controle negativo. As linhas horizontais pontilhadas representam o ponto de *cutoff* de seleção positiva (≥ 5 SFC/5x10⁵ células). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

Posteriormente, os peptídeos identificados como imunogênicos, segundo o nosso critério (≥ 5 SFC/5x10⁵ células), foram selecionados para a realização dos testes de ELISPOT com células provenientes de camundongos individuais ($n=5$). Considerando que os peptídeos N66 e N67 são adjacentes, e, portanto, englobam em grande parte a mesma região da proteína NS1, escolhemos somente um deles (N67) para os testes com os esplenócitos coletados individualmente de cada animal. Todos os três peptídeos testados (N17, N46 e N67) foram capazes de promover uma resposta de IFN- γ estatisticamente significativa em células isoladas de camundongos vacinados quando comparados com o controle pcTPA (Figura 4.2), embora a resposta frente à estimulação com o peptídeo N67 tenha sido a mais alta.

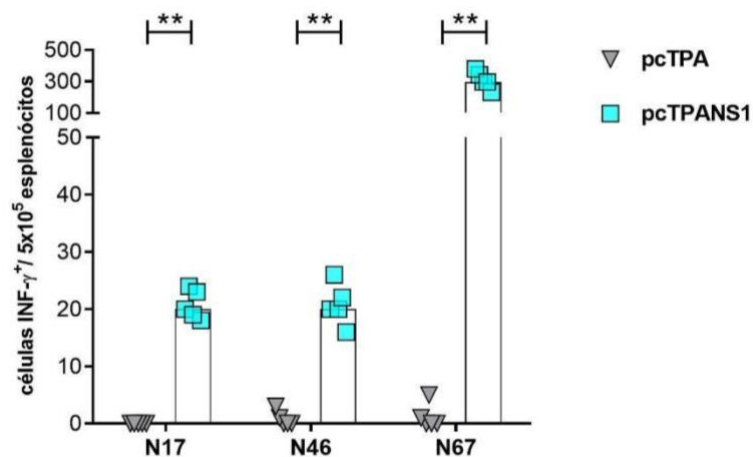


Figura 4.2: Número de células produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos NS1, avaliado individualmente em cada camundongo BALB/c imunizado com pcTPANS1. Esplenócitos isolados dos camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5) foram incubados por 18 horas com os peptídeos NS1 previamente selecionados, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ensaio de ELISPOT. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA foram usadas como controle negativo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (**p<0,01). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

Seguindo os mesmos critérios anteriores, realizamos os ensaios de ELISPOT para avaliar a produção de IFN- γ , frente a essa mesma biblioteca de peptídeos NS1, mas dessa vez analisando a resposta 21 dias após um desafio com DENV2. Observamos que o espectro de resposta se mostrou consideravelmente mais amplo após desafio viral, com diferenças significativas quando comparamos a produção de IFN- γ em células isoladas de camundongos vacinados e desafiados e de animais não imunizados (*naïves*) ou apenas infectados com DENV2. Comparando os peptídeos individualmente, também observamos aumento na produção da citocina induzida pelo estímulo com cada peptídeo.

A produção de IFN- γ foi detectada na presença de 6 *pools* de peptídeos NS1 (*pools* 2, 4, 5, 7, 8 e 9) (Figura 4.3A). Posteriormente, os testes realizados com os peptídeos individuais pertencentes aos *pools* selecionados revelaram como positivos os peptídeos N12, N14-20, N35, N41-43, N46-N50, N64, N66-67, N70-72, N76 e N69 (Figura 4.3B), confirmando o espectro de resposta mais amplo após o desafio com DENV2.

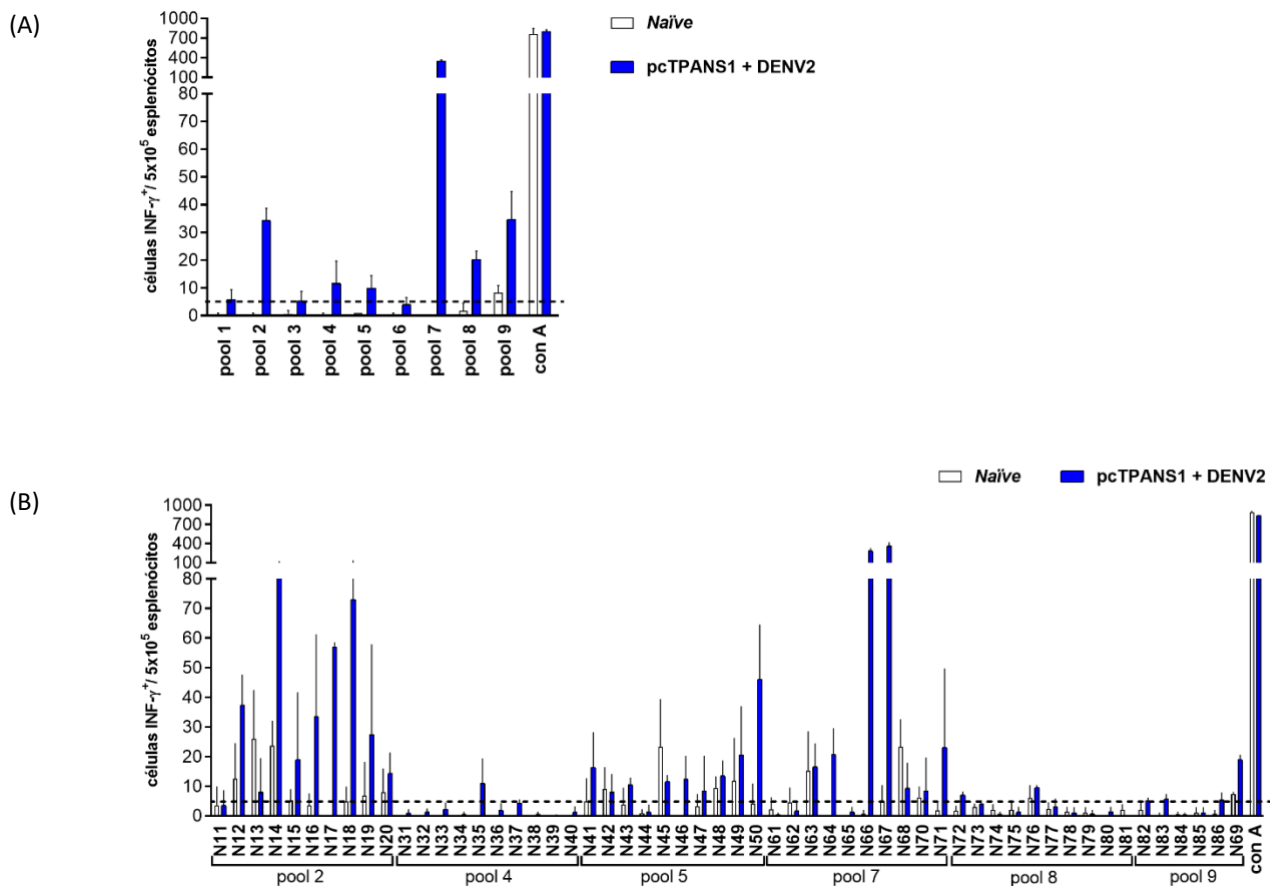


Figura 4.3: Produção de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1 em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c ($n=3$, *pool*) imunizados com duas doses de pcTPANS1 e desafiados com DENV2 foram incubados por 18 horas com os peptídeos de NS1, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ensaio de ELISPOT. Peptídeos foram analisados em *pools* (A) e selecionados para avaliação individual (B). Células isoladas de camundongos *naïves* foram usadas como controle negativo. As linhas horizontais pontilhadas representam o ponto de *cutoff* de seleção (≥ 5 SFC/5x10⁵ células). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

Selecionamos então os peptídeos N12, N14, N17, N18, N19, N35, N41, N43, N46, N48, N49, N50, N64, N67, N71, N76 e N69 para a realização dos testes utilizando células de animais individuais, com avaliação da produção de IFN- γ após 7 dias de infecção. A produção de IFN- γ foi estatisticamente diferente após estímulo com apenas 7 peptídeos (N12, N14, N17, N35, N41, N46 e N67) quando comparamos células de animais vacinados e *naïves* (Figura 4.4).

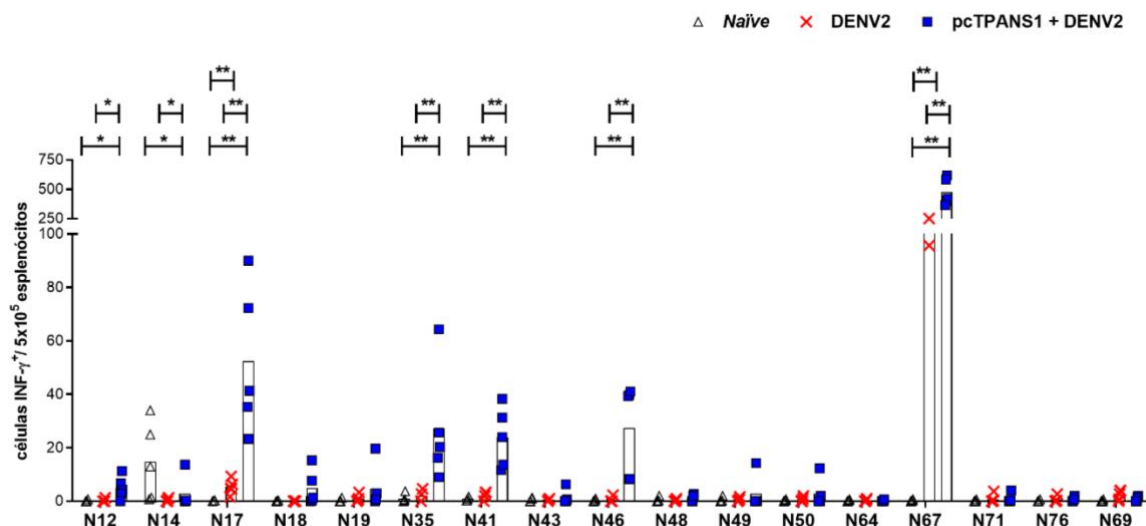


Figura 4.4: Número de células produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1, avaliado individualmente nos camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5) e desafiados com DENV2 (cepa NGC) foram incubados por 18 horas com os peptídeos de NS1 previamente selecionados, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ensaio de ELISPOT. Células isoladas de camundongos *naives* foram usadas como controle negativo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

4.2 Caracterização das populações de linfócitos T ativadas frente ao estímulo com peptídeos de NS1

A etapa seguinte no nosso estudo foi caracterizar as respostas peptídeo-específicas produzidas por células T CD4⁺ ou CD8⁺ através da detecção da produção das citocinas IFN- γ e TNF- α por ensaios de marcação intracelular de citocinas (ICS, “*Intracellular Cytokine Staining*”). Para isso, foram utilizados esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a vacina pcTPANS1, antes e após desafio viral com DENV2. Após um período de 6 horas de estimulação com peptídeos de NS1, selecionados de acordo com os resultados prévios de ELISPOT, analisamos a produção dessas citocinas em populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺. A estratégia de análise está representada na figura (4.5), de acordo com os parâmetros escolhidos para células produtoras de IFN- γ .

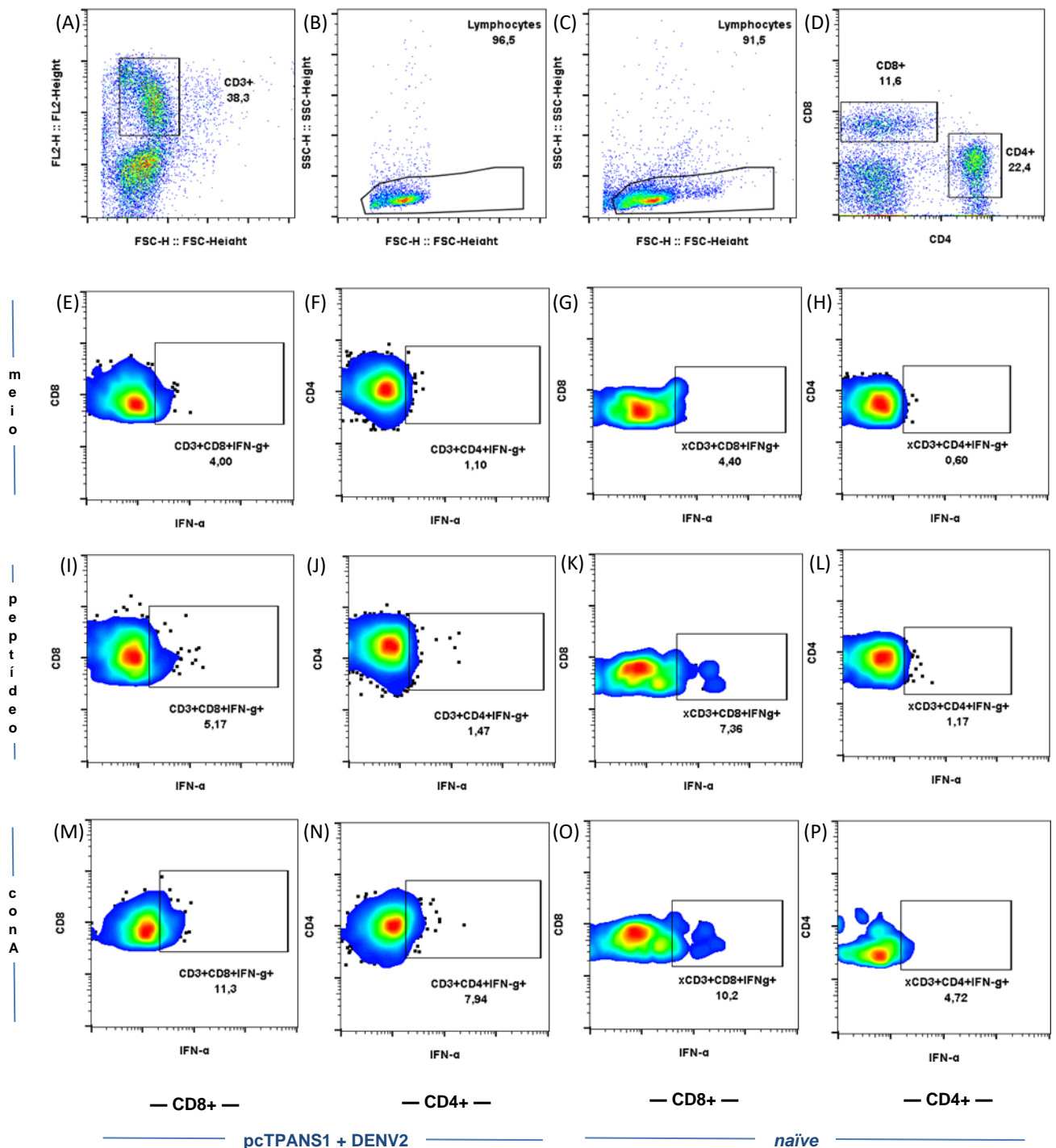


Figura 4.5: Estratégia de análise das populações de esplenócitos produtores de IFN- γ . Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1, desafiados ou não com DENV2, foram estimulados por 6 horas com peptídeos previamente selecionados e analisados por citometria de fluxo para identificação de populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ . As células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 PE, anti-CD4 APC e anti-CD8 PerCP para análise de produção de IFN- γ . Posteriormente as células foram marcadas intracelularmente com anticorpos anti-IFN- γ AlexaFluor 488. Primeiramente a análise de linfócitos foi feita a partir de um *retogate* da população CD3⁺ (A) em um gráfico de densidade das frequências (tamanho x granulosidade) (B-C), e a partir deste, selecionando as populações CD3⁺CD4⁺ e CD8⁺CD3⁺ (D). As células IFN- γ ⁺ foram analisadas dentro da seleção CD4⁺CD3⁺ e CD8⁺CD3⁺ (E-P). Acima estão dois exemplos representativos de células oriundas de um camundongo vacinado e desafiado (à esquerda) e de um camundongo *naïve* (à direita), estimuladas com meio (E-H), peptídeo (I-L) ou com concanavalina A (M-P).

Quando avaliando as respostas de células T CD4⁺ nos esplenócitos isolados de camundongos após a vacinação com pcTPANS1, observamos um aumento significativo na

produção de IFN- γ induzido após estímulo com o peptídeo N46, quando comparado com as respostas de células isoladas do grupo controle pcTPA (Figura 4.6A). Também observamos uma tendência ao aumento da produção de IFN- γ após estímulo com os peptídeos N17 e N67, apesar de esta não ser estatisticamente significativa. Após o desafio viral todos os peptídeos foram capazes de induzir uma maior produção de IFN- γ (Figura 4.6B). A média das frequências de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ corresponderam a 1,87% das células T CD4⁺ totais.

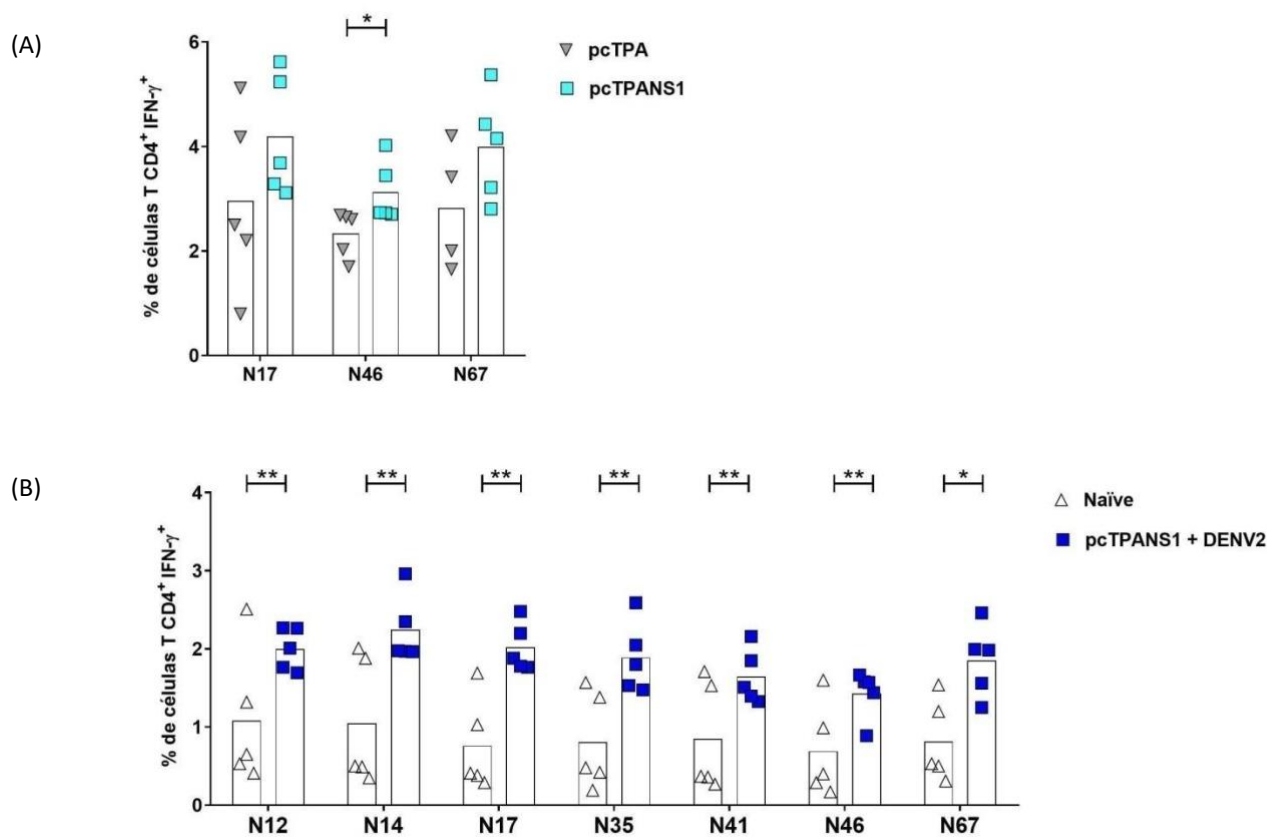


Figura 4.6: Frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com peptídeos de NS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5), desafiados ou não com DENV2, foram incubados por 6 horas com peptídeos de NS1 previamente selecionados, e a produção de IFN- γ foi detectada por ensaio ICS. Os peptídeos foram selecionados de acordo com os resultados prévios de ELISPOT após vacinação (A) e 7 dias após infecção (B). Números indicam a porcentagem de células T CD4⁺ positivas para IFN- γ em relação aos esplenócitos totais conforme analisado por citometria de fluxo. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA (A) ou *naive* (B) foram usadas como controles negativos. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

Quando comparamos as respostas de células T CD8⁺ entre os grupos vacinado e controle, observamos que os peptídeos NS1 selecionados não foram capazes de induzir maiores frequências de células produtoras de IFN- γ (Figura 4.7A). Após o desafio viral apenas os peptídeos N14, N17 e N67 induziram diferenças significativas, sendo o peptídeo N67 o indutor das maiores frequências de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ (7,56%) (Figura 4.7B).

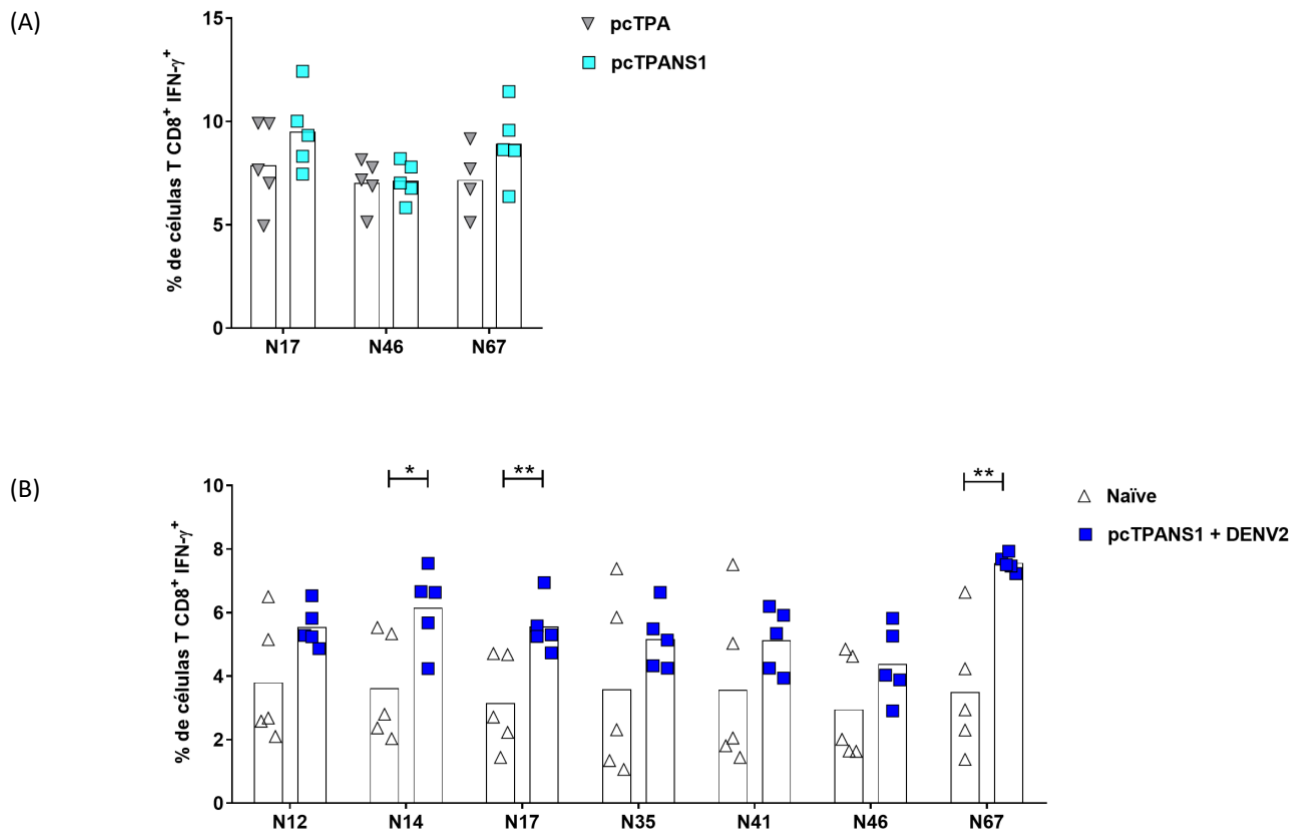


Figura 4.7: Frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ frente a estímulos com os peptídeos de NS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5), desafiados ou não com DENV2, foram incubados por 6 horas com os peptídeos de NS1 previamente selecionados, e a produção de IFN- γ foi detectada por ensaio de ICS. Os peptídeos foram selecionados de acordo com resultados prévios de ELISPOT após vacinação (A) e 7 dias após infecção com DENV2 (B). Os números indicam as porcentagens de células T CD4⁺ positivas para IFN- γ em relação aos esplenócitos totais conforme analisado por citometria de fluxo. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA (A) ou *naives* (B) foram usadas como controles negativos. Os asteriscos indicam as diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

Nós também avaliamos as frequências de linfócitos T produtores de TNF- α . A estratégia de análise está representada na figura (4.8), de acordo com os parâmetros escolhidos para células produtoras de TNF- α .

Quanto às frequências de células T CD4⁺ TNF- α ⁺, estas não foram estatisticamente significativas quando comparamos a produção dessa citocina em células de camundongos imunizados com pcTPANS1 e em animais inoculados com pcTPA (Figura 4.9A). Igualmente, após o desafio viral, apenas um peptídeo (N17) foi capaz de induzir uma resposta de TNF- α , significativamente mais alta comparada com o grupo controle (Figura 4.9B). Também foi observada uma tendência a um aumento da resposta quando as células do grupo vacinado foram estimuladas com os peptídeos N67 (p<0,095), embora essa tendência não tenha sido significativa.

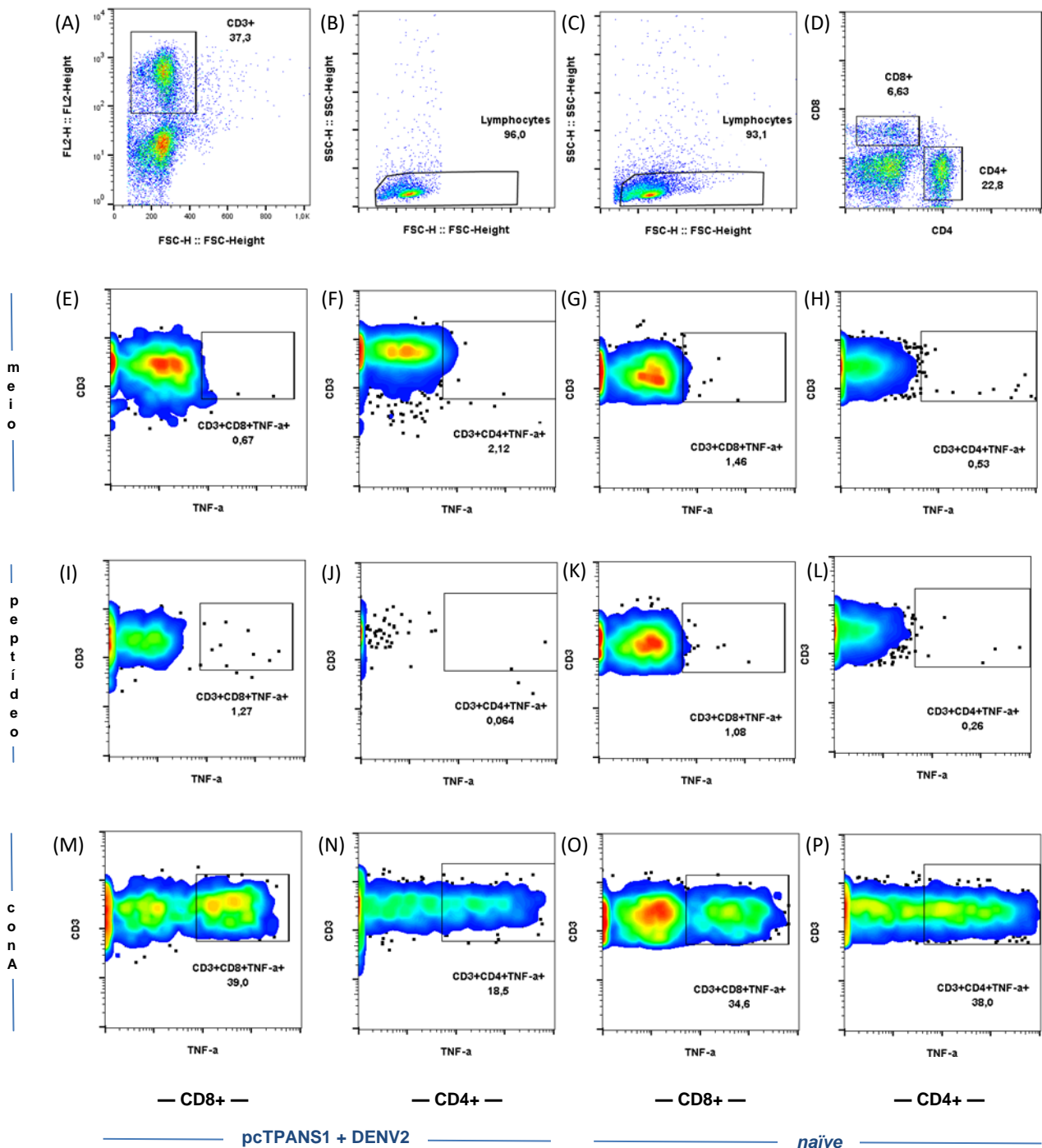


Figura 4.8: Estratégia de análise das populações de esplenócitos produtores de TNF- α . Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1, desafiados ou não com DENV2, foram estimulados por 6 horas com peptídeos previamente selecionados e analisados por citometria de fluxo para identificação de populações de células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ produtoras de TNF- α . As células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 PE, anti-CD4 PerCP e anti-CD8 FITC para análise de produção de TNF- α . Posteriormente as células foram marcadas intracelularmente com anticorpos anti-TNF- α AlexaFluor 647. Primeiramente a análise de linfócitos foi feita a partir de um *retogate* da população CD3 $^{+}$ (A) em um gráfico de densidade das frequências (tamanho x granulosidade) (B-C), e a partir deste, selecionando as populações CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ CD3 $^{+}$ (D). As células TNF- α $^{+}$ foram analisadas dentro da seleção CD4 $^{+}$ CD3 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ CD3 $^{+}$ (E-P). Acima estão dois exemplos representativos de células oriundas de um camundongo vacinado e desafiado (à esquerda) e de um camundongo *naïve* (à direita), estimuladas com meio (E-H), peptídeo (I-L) ou com concanavalina A (M-P).

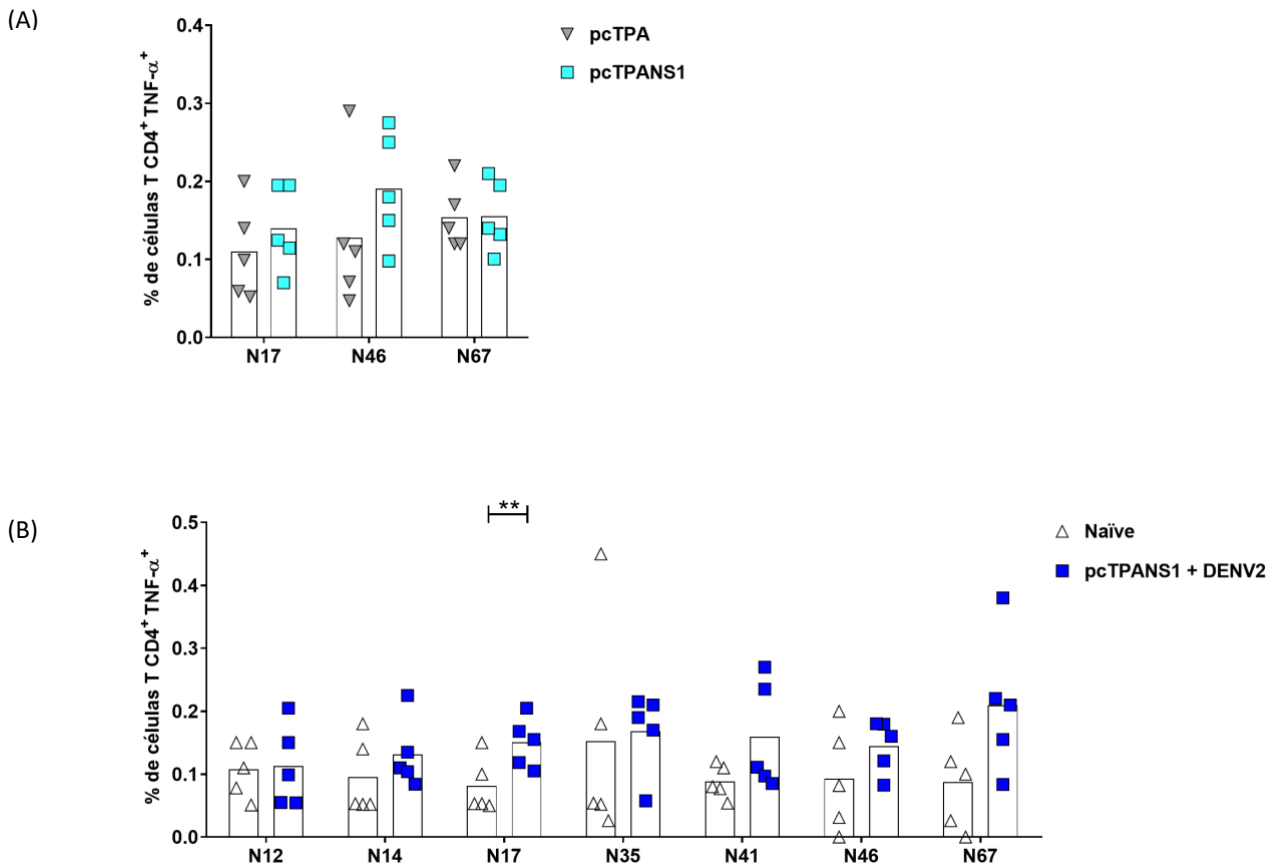


Figura 4.9: Frequências de células T CD4⁺ produtoras de TNF- α frente ao estímulo com peptídeos de NS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5), desafiados ou não com DENV2, foram incubados por 6 horas com peptídeos de NS1 previamente selecionados, e a produção de TNF- α foi detectada por ensaio ICS. Os ensaios foram realizados com esplenócitos coletados após a vacinação (A) e 7 dias após infecção (B). Números indicam as porcentagens de células T CD4⁺ positivas para TNF- α em relação aos esplenócitos totais conforme analisado por citometria de fluxo. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA (A) ou *naïves* (B) foram usadas como controles negativos. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

Quanto à produção de TNF- α em células T CD8⁺ provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1, as respostas peptídeo-específicas foram apenas significativamente maiores após estímulo com o peptídeo N67 (2,9 vezes maior quando comparado com o grupo controle) (Figura 4.10A). De forma similar, o desafio viral não alterou significativamente as frequências de células T CD8⁺ produtoras de TNF- α , exceto após estímulo com peptídeo N67 (4 vezes maior que no grupo *naïve*) (Figura 4.10B).

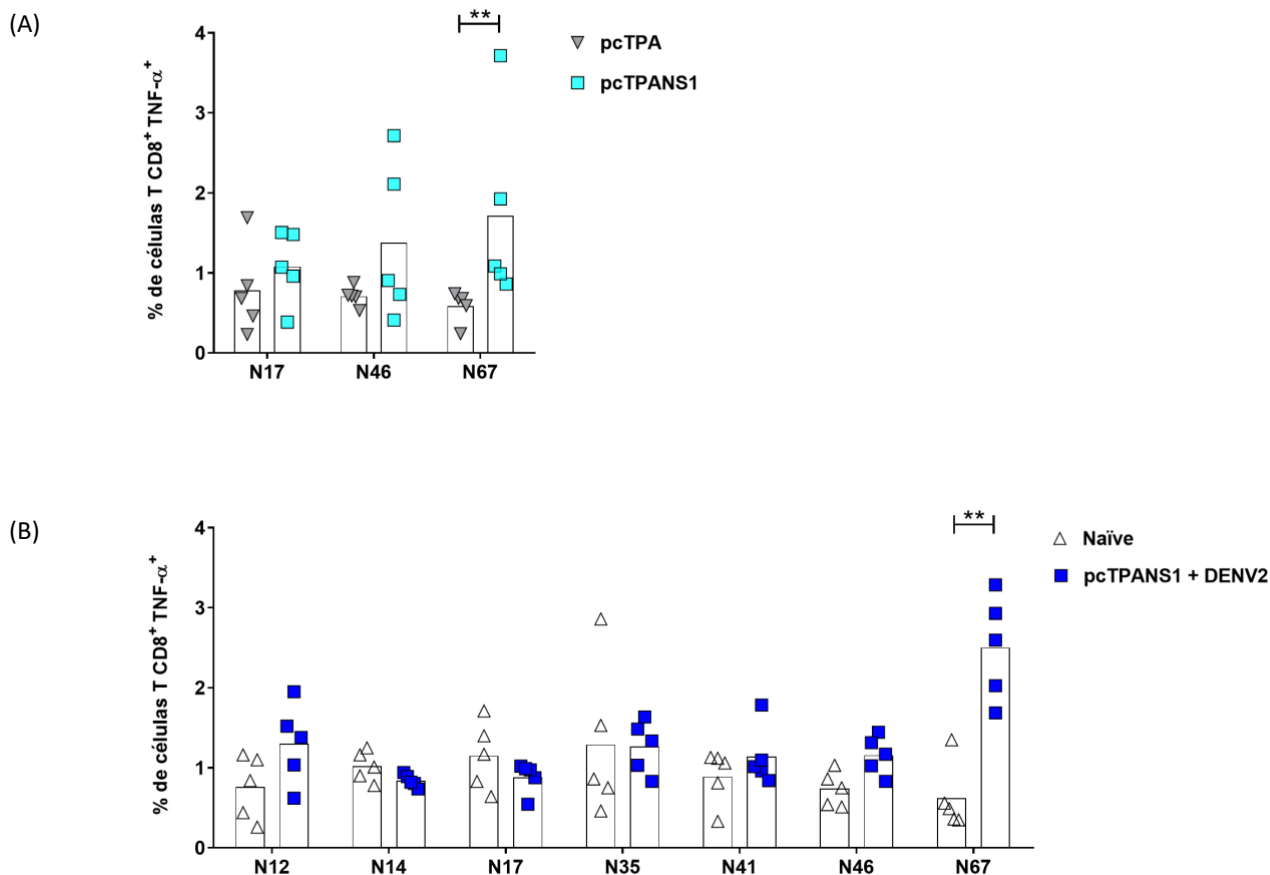


Figura 4.10: Frequências de células T CD8⁺ produtoras de TNF- α frente a estímulo com peptídeos NS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5), desafiados ou não com DENV2, foram incubados por 6 horas com peptídeos de NS1 previamente selecionados, e a produção de TNF- α foi detectada por ensaio ICS. Os ensaios foram realizados com esplenócitos coletados após a vacinação (A) e 7 dias após infecção (B). Números indicam as porcentagens de células T CD8⁺ positivas para TNF- α em relação aos esplenócitos totais conforme analisado por citometria de fluxo. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA (A) ou *naïves* (B) foram usadas como controles negativos. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

As tabelas a seguir sumarizam os resultados dos experimentos de ELISPOT e ICS. Os peptídeos identificados neste trabalho estão disponíveis na base de dados *IEDB.org* (<http://www.iedb.org/>) para armazenamento e predição de epítomos. Parte dos resultados deste trabalho foi incluída no artigo “T Cell Responses Induced by DNA Vaccines Based on the DENV2 E and NS1 Proteins in Mice: Importance in Protection and Immunodominant Epitope Identification” publicado na revista *Frontiers in Immunology* em julho de 2019 (Anexo I).

Tabela 4.1: Características dos peptídeos de NS1 imunogênicos

Peptídeo NS1	Sequência	Localização na proteína*	Grau de significância ELISPOT**		
			pcTPANS1	pcTPANS1 + DENV2	DENV2
N12	AIQKAHEEGICGIRS	45-59	—	+	NS
N14	GICGIRSVTRLENLM	53-67	—	+	NS
N17	NLMWKQITPELNHIL	65-79	++	+++	+
N35	GPETAECPTNRAWN	137-151	—	++	NS
N41	GVFTTNIWLKLEKQ	161-175	—	++	NS
N46	SKLMSAAIKDNRAVH	181-195	++	++	NS
N67	AGPWHLGKLEMDDFD	265-279	++++	++++	++++

*A localização dos peptídeos de acordo com a sequência da proteína NS1 de DENV2 (cepa NGC). ** O grau de significância foi dado de acordo com os resultados dos ensaios de ELISPOT realizados com células de camundongos BALB/c testados individualmente e representado de acordo com a seguinte escala arbitrária: (+): ≥ 5 a 20; (++): 21 a 50, (+++): 51 a 100, (++++): ≥ 100 células produtoras de INF- γ /5x10⁵ esplenócitos. (—): resultado não-existente; (NS): não-estatístico.

Tabela 4.2: Porcentagem de células T positivas quanto à produção de INF- γ e TNF- α frente ao estímulo com peptídeos de NS1

Peptídeo NS1	% de células T IFN- γ ⁺				% de células T TNF- α ⁺			
	pcTPANS1		pcTPANS1 + DENV2		pcTPANS1		pcTPANS1 + DENV2	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
N12	—	—	2 ± 0,3	5,5 ± 0,6	—	—	0,1 ± 0,06	1,3 ± 0,5
N14	—	—	2,2 ± 0,4	6,2 ± 1,3	—	—	0,1 ± 0,05	0,8 ± 0,1
N17	4,2 ± 1,2	9,5 ± 1,9	2 ± 0,3	5,6 ± 0,8	0,1 ± 0,05	1,1 ± 0,4	0,2 ± 0,04	0,9 ± 0,2
N35	—	—	1,9 ± 0,4	5,2 ± 1	—	—	0,2 ± 0,06	1,3 ± 0,3
N41	—	—	1,7 ± 0,3	5,1 ± 1	—	—	0,2 ± 0,09	1,1 ± 0,4
N46	3,1 ± 0,6	7,1 ± 0,9	1,4 ± 0,3	4,4 ± 1,2	0,2 ± 0,1	1,4 ± 1	0,1 ± 0,04	1,2 ± 0,2
N67	4 ± 1	9 ± 1,8	1,9 ± 0,5	7,6 ± 0,3	0,2 ± 0,04	1,7 ± 1,2	0,2 ± 0,1	2,5 ± 0,6

Os números representam a média das frequências obtidas através de ensaios ICS \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados por citometria de fluxo. (—): resultado não-existente.

4.3 Avaliação de citotoxicidade *in vivo* em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 frente a estímulo com peptídeos NS1

De forma a avaliar a funcionalidade das células T responsivas ao estímulo com os peptídeos identificados até então, realizamos um ensaio de citotoxicidade *in vivo* conforme protocolo delineado no item 3.7 da seção Materiais e Métodos. Para esse ensaio nós selecionamos os quatro peptídeos que geraram diferenças significativas nos testes anteriores: N14, N17, N35 e N67.

Resumidamente, três dias após o desafio com DENV2, os grupos de animais BALB/c inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA receberam esplenócitos marcados com CFSE, uma mistura na qual metade das células foram marcadas com baixa (*Low*) concentração de CFSE (50 μ M), e a outra metade marcada com alta (*High*) concentração de CFSE (500 μ M). Os esplenócitos marcados com altas concentrações de CFSE também foram incubados por um período de 45 minutos com os peptídeos selecionados. Cada grupo recebeu esplenócitos incubados com um dos quatro peptídeos. Vinte horas após a transferência de células, os camundongos foram submetidos à eutanásia e seus esplenócitos coletados e processados para avaliação por citometria de fluxo.

Esse ensaio preconiza que as células T citotóxicas de memória geradas através da imunização com pcTPANS1 responderão aos esplenócitos (entre estes, células apresentadoras de antígeno) pulsados com os peptídeos selecionados e marcados com CFSE_{High}, de forma a ativar uma resposta citotóxica proporcional ao estímulo do peptídeo. Foram avaliadas as frequências de esplenócitos marcados com CFSE_{Low} e CFSE_{High} em cada camundongo comparando a proporção entre essas duas populações através da fórmula: lise celular (%) = $(1 - \text{CFSE}_{\text{high}}/\text{CFSE}_{\text{low}}) \times 100$. Uma vez que as células marcadas com CFSE_{Low} não foram pulsadas com peptídeo, sua proporção de decaimento representa uma resposta citotóxica inespecífica. Nesse sentido, o decaimento da população CFSE_{High} em relação à população CFSE_{Low} indica uma resposta citotóxica específica direcionada ao peptídeo testado.

Em nosso primeiro ensaio avaliamos as proporções de células CFSE_{Low} e CFSE_{High} em grupos de camundongos vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 ou inoculados com o plasmídeo controle pcTPA, de forma a discernir se a imunização com o pcTPANS1 seria capaz de gerar respostas citotóxicas específicas frente aos peptídeos selecionados. Antes da

transferência das células, separamos para análise no tempo T_0 as amostras de cada uma das misturas de esplenócitos CFSE_{Low} e CFSE_{High}, estes últimos incubados com cada um dos peptídeos (N14, N17, N35 ou N67) separadamente. O nosso intuito era conferir se a mesma quantidade de células CFSE_{Low} e CFSE_{High} havia sido transferida para os camundongos, mantendo uma proporção 1:1. Conforme demonstrado na figura 4.11B, a média das frequências das células CFSE_{Low} e CFSE_{High} transferidas foi de aproximadamente 45% de células CFSE_{Low} e 55% de células CFSE_{High}. A estratégia de análise dos esplenócitos a partir de uma amostra não marcada com CFSE de camundongo *naïve* também está representada na figura 4.11A.

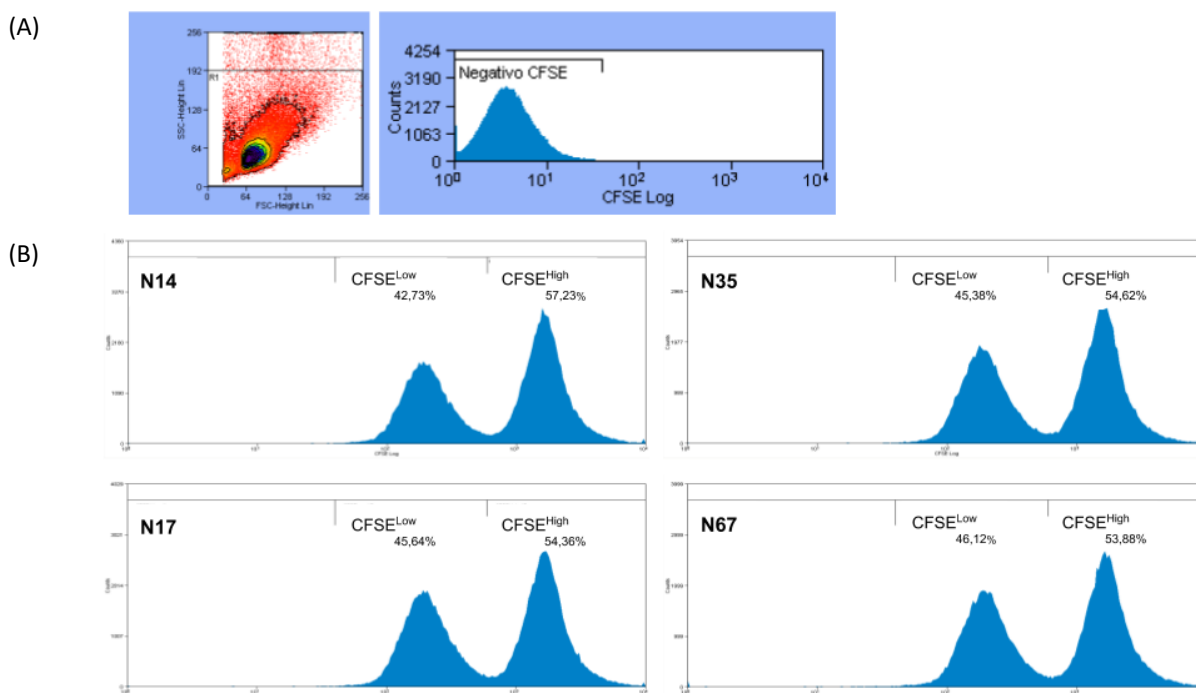


Figura 4.11: Ensaio de Citotoxicidade *in vivo* utilizando esplenócitos estimulados com os peptídeos N14, N17, N35 e N67. Gráfico de pontos (tamanho x granulosidade) representativo dos esplenócitos coletados de animais *naïves*, não marcados com CFSE, dentro do *gate* utilizado (A) e histogramas representativos dos tempos T_0 figurando as populações CFSE_{high} e CFSE_{low} de esplenócitos incubados com os quatro peptídeos selecionados para o ensaio: N14, N17, N35 e N67 (B). Quantidade normalizada para 100.000 eventos. Análise realizada no programa Summit versão 4.3 (Cytomation).

Quando analisamos a quantidade total de eventos positivos dentro dos *gates* CFSE_{Low} e CFSE_{High} e suas frequências nas amostras obtidas de animais inoculados com o pCTPANS1 ou pCTPA, observamos poucas diferenças entre o grupo vacinado e o controle após a transferência de células estimuladas com os diferentes peptídeos (Figura 4.12).

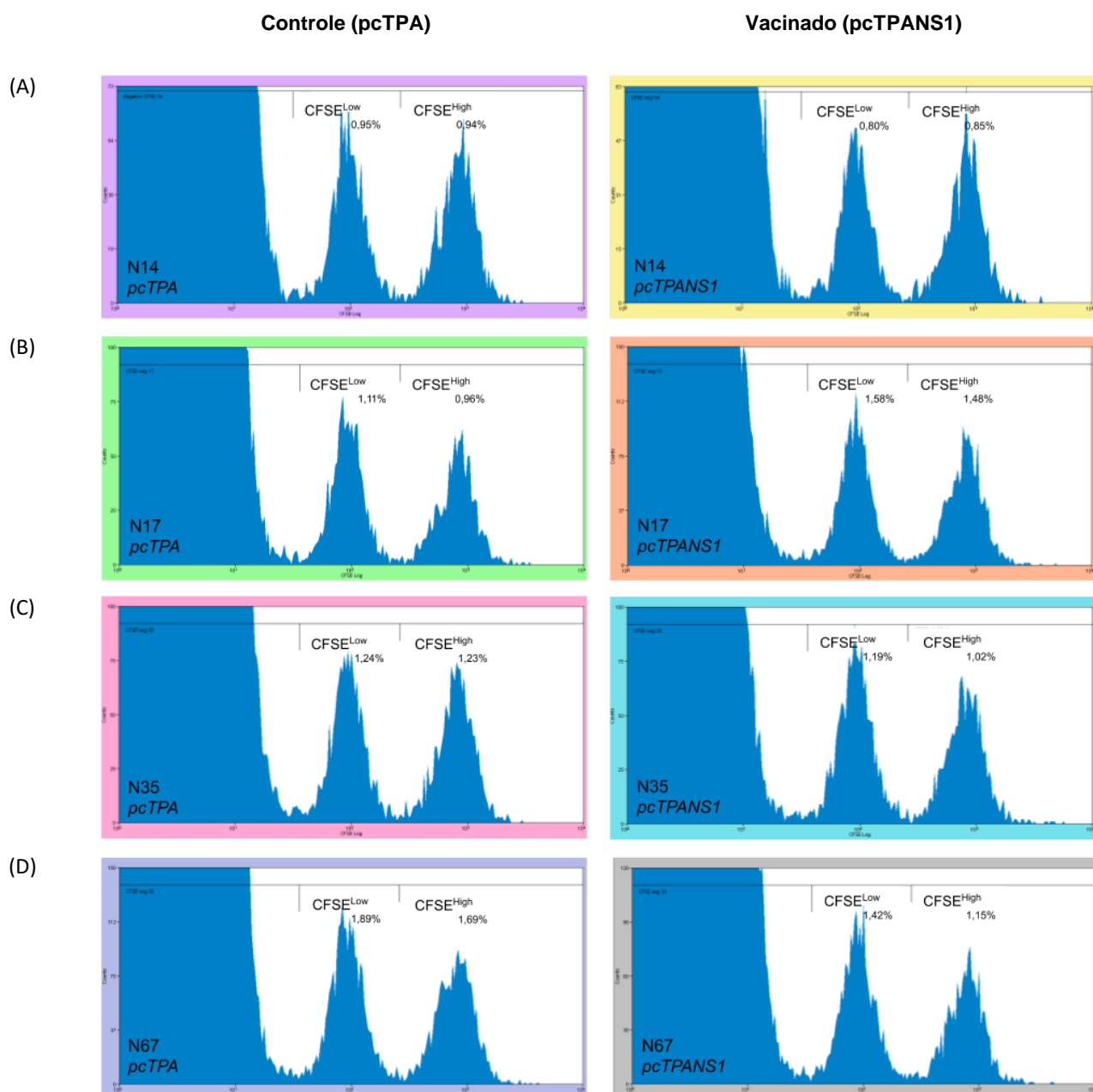


Figura 4.12: Análise das populações CFSE_{Low} e CFSE_{High} em esplenócitos de camundongos inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA após transferência de células, pulsados com N14, N17, N35 e N67. Vinte horas após a transferência de células pulsadas e não pulsadas com os diferentes peptídeos, os animais inoculados com o pcTPANS1 ou pcTPA e desafiados com DENV2 foram submetidos à eutanásia e seus esplenócitos processados para avaliação por citometria de fluxo. Os histogramas acima são representativos das populações CFSE_{Low} e CFSE_{High} e suas frequências na população de esplenócitos totais dentro do *gate* R1. Histogramas em (A) representam as amostras que foram pulsadas com o peptídeo N14, com o peptídeo N17 (B), N35 (C) e N67 (D). Quantidades normalizadas para 100.000 eventos. Análise realizada no programa Summit versão 4.3 (Cytomation).

De fato, ao analisarmos as quantidades totais de eventos através da fórmula estabelecida, não observamos quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos vacinado e controle (Figura 4.13). A exceção foi observada nos grupos de animais que receberam as células pulsadas com o peptídeo N14, resultando em uma citotoxicidade significativamente abaixo do nível normal (Figura 4.13). Os valores de lise nas células provenientes dos

camundongos inoculados com o pcTPA e pcTPANS1, respectivamente, foram: 4,6% e -3% no grupo pulsado com o peptídeo N14; 9,9% e 8,9% no grupo pulsado com o peptídeo N17; 9,3% e 12,8% no grupo pulsado com o peptídeo N35; e 14,9% e 17,4% no grupo pulsado com o peptídeo N67.

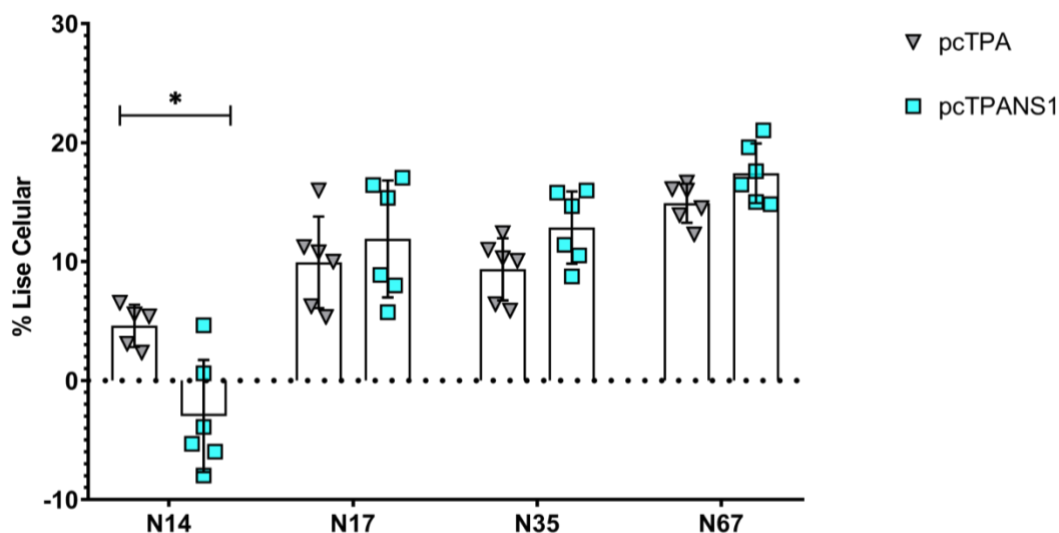


Figura 4.13: Porcentagem de lise celular induzida nos camundongos que receberam esplenócitos pulsados com os peptídeos N14, N17, N35 e N67. Vinte horas após a transferência de células, os animais inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou o pcTPA e desafiados com DENV2 foram submetidos à eutanásia e seus esplenócitos processados para avaliação por citometria de fluxo. A porcentagem de lise celular foi calculada através da fórmula: $\text{lise celular (\%)} = (1 - \text{CFSE}_{\text{high}}/\text{CFSE}_{\text{low}}) \times 100$. As barras representam as médias e o desvio padrão dos grupos inoculados com o pcTPA (triângulos cinzas) e pcTPANS1 (quadrados azuis). Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (* $p < 0,05$). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

Com o objetivo de avaliar se os níveis baixos de citotoxicidade induzida pelos peptídeos selecionados foi devido a um erro experimental ou devido à natureza desses mesmos peptídeos, nós repetimos esse ensaio utilizando um peptídeo de NS1 de menor tamanho, ${}_{265}\text{AGPWHLGKL}_{273}$, descrito na literatura (Gao *et al.*, 2008) e previamente utilizado em estudos de citotoxicidade pelo nosso grupo (Gonçalves *et al.*, 2015). Nesse ensaio utilizamos também o peptídeo N67 (${}_{265}\text{AGPWHLGKLEMDFDF}_{279}$), que contém em sua sequência o peptídeo utilizado como controle positivo.

Sendo assim, repetimos o experimento como descrito acima e pulsamos os esplenócitos marcados com CFSE High com os peptídeos N67 e peptídeo controle. Novamente, a média das frequências das células CFSE_{Low} e $\text{CFSE}_{\text{High}}$ transferidas foi de aproximadamente 45% de células CFSE_{Low} e 55% de células $\text{CFSE}_{\text{High}}$, conforme mostrado na figura 4.14B. O esquema da estratégia de análise dos esplenócitos por citometria de fluxo também está descrito na figura 4.14A.

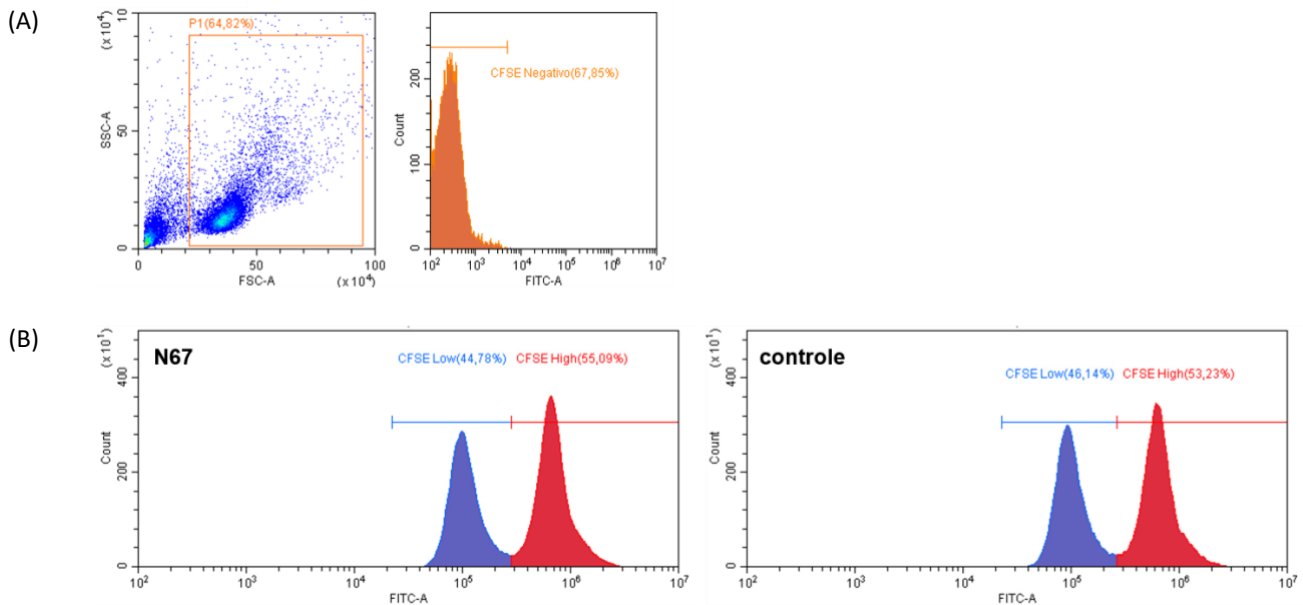


Figura 4.14: Ensaio de Citotoxicidade *in vivo* utilizando esplenócitos pulsados com os peptídeos N67 e controle. Gráfico de pontos (tamanho x granulosidade) representativo dos esplenócitos coletados de animais *naïve*, não marcados com CFSE (A) e histogramas representativos dos tempos T₀, figurando as populações CFSE_{high} e CFSE_{low} de esplenócitos incubados com o peptídeo N67 e controle (B). Valores normalizados para 100.000 eventos. Análise realizada no programa CytExpert (Beckman Coulter).

Analisamos então a proporção de eventos positivos dentro dos *Gates* CFSE_{Low} e CFSE_{High} após a transferência das células e observamos uma diferença significativa entre as amostras de animais inoculados com o pcTPA e o pcTPANS1 que receberam a mistura de esplenócitos pulsados com o peptídeo controle (Figura 4.15). Contudo, esta diferença não foi observada no ensaio utilizando esplenócitos pulsados com o peptídeo N67.

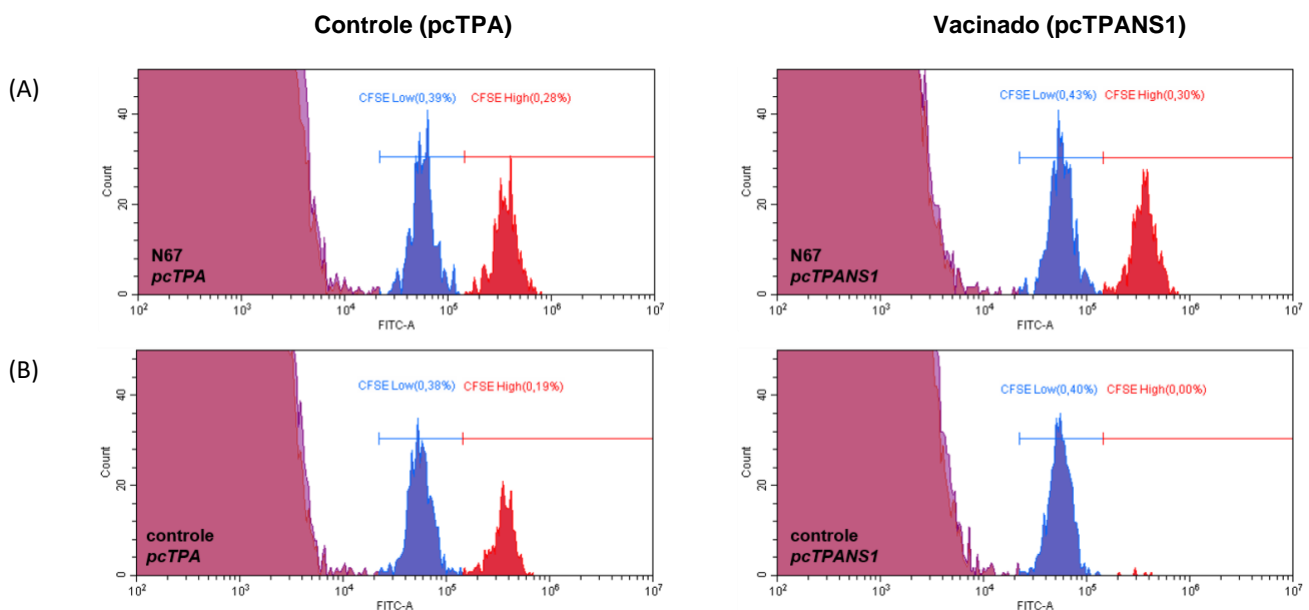


Figura 4.15: Análise das populações CFSE_{Low} e CFSE_{High} em esplenócitos de camundongos inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA após transferência de células, pulsados com N67 e peptídeo controle. Vinte horas após a transferência de células, animais inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA e desafiados com DENV2 foram submetidos à eutanásia e seus esplenócitos processados para avaliação por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos das populações CFSE_{Low} e CFSE_{High} e suas frequências na população de

esplenócitos totais. Histogramas em (A) representam as amostras que foram pulsadas com o peptídeo N67 e os histogramas em (B) representam aquelas pulsadas com o peptídeo controle. Valores normalizados para 100.000 eventos. Análise realizada no programa CytExpert (BeckmanCoulter).

Transformando os valores de eventos positivos para $CFSE_{Low}$ e $CFSE_{High}$ a partir da fórmula anteriormente mencionada, observamos a taxa de lise celular de 96,8% em camundongos imunizados com o pcTPANS1 que receberam esplenócitos pulsados com o peptídeo controle (Figura 4.16). Esta proporção representa aproximadamente o dobro da observada nos camundongos inoculados com o pcTPA que receberam esplenócitos pulsados com o mesmo peptídeo (49,5%). Em contraste, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas taxas de lise celular detectadas nos camundongos vacinados e não vacinados que receberam esplenócitos pulsados com o peptídeo N67 (31,8% e 24,4%, respectivamente) (Figura 4.16).

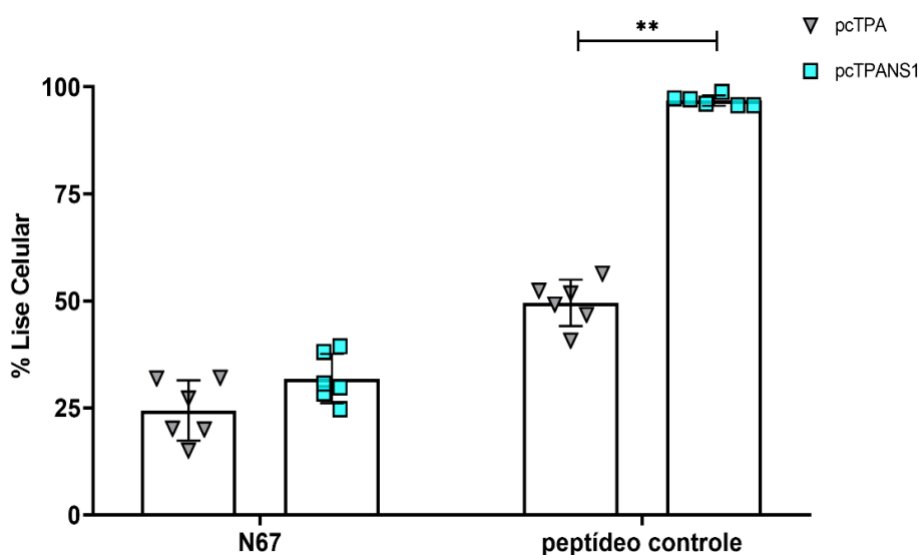


Figura 4.16: Porcentagem de lise celular induzida nos camundongos que receberam esplenócitos pulsados com os peptídeos N67 e controle. Vinte horas após a transferência de células, os animais inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA e desafiados com DENV2 foram submetidos à eutanásia e seus esplenócitos processados para avaliação por citometria de fluxo. A porcentagem de lise celular foi calculada através da fórmula: $\text{lise celular (\%)} = (1 - CFSE_{high}/CFSE_{low}) \times 100$. As barras representam as médias e o desvio padrão dos grupos inoculados com pcTPA (triângulos cinzas) e pcTPANS1 (quadrados azuis). Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (** $p < 0,01$). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

Com este resultado confirmamos que a execução do ensaio de citotoxicidade estava correta, entretanto este só foi eficiente quando utilizamos o peptídeo controle, que possui 9 aminoácidos ao invés de 15, como os outros peptídeos testados. Sendo assim, realizamos um outro ensaio, incubando os esplenócitos com os peptídeos N67 e controle por um período maior, 6 horas ao invés de 45 minutos, tempo este semelhante ao utilizado nos ensaios de ICS, em uma tentativa de melhorar a apresentação dos peptídeos. Entretanto, tal ensaio se mostrou inviável, uma vez que a maioria das células morreu após ao período de incubação

com os peptídeos e não foi possível detectar qualquer diferença nos níveis de lise celular em animais vacinados com o pcTPANS1 e os controles inoculados com o pcTPA, que receberam os esplenócitos estimulados com os dois peptídeos.

4.4 Avaliação de citotoxicidade *in vitro* em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 frente ao estímulo com os peptídeos N67 e controle ${}_{265}\text{AGPWHLGKL}_{273}$

Realizamos um experimento piloto para a avaliação de atividade citotóxica *in vitro*, através da marcação das células expondo moléculas de CD107a em sua superfície. Para a realização desse ensaio, incubamos esplenócitos oriundos de camundongos BALB/c inoculados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 ou somente inoculados com pcTPA. Recolhemos os esplenócitos três dias após o desafio viral do grupo vacinado e incubamos essas células com o peptídeo N67 ou controle ${}_{265}\text{AGPWHLGKL}_{273}$ por 4 horas, tempo ideal estabelecido a partir dos nossos testes de titulação. Células incubadas apenas com meio RPMI também foram adicionadas de forma a estabelecer o nível de ativação basal de cada grupo. A estratégia de análise das células T CD3+CD4+CD107a+ ou T CD3+CD8+CD107a+ está delineada na figura 4.17:

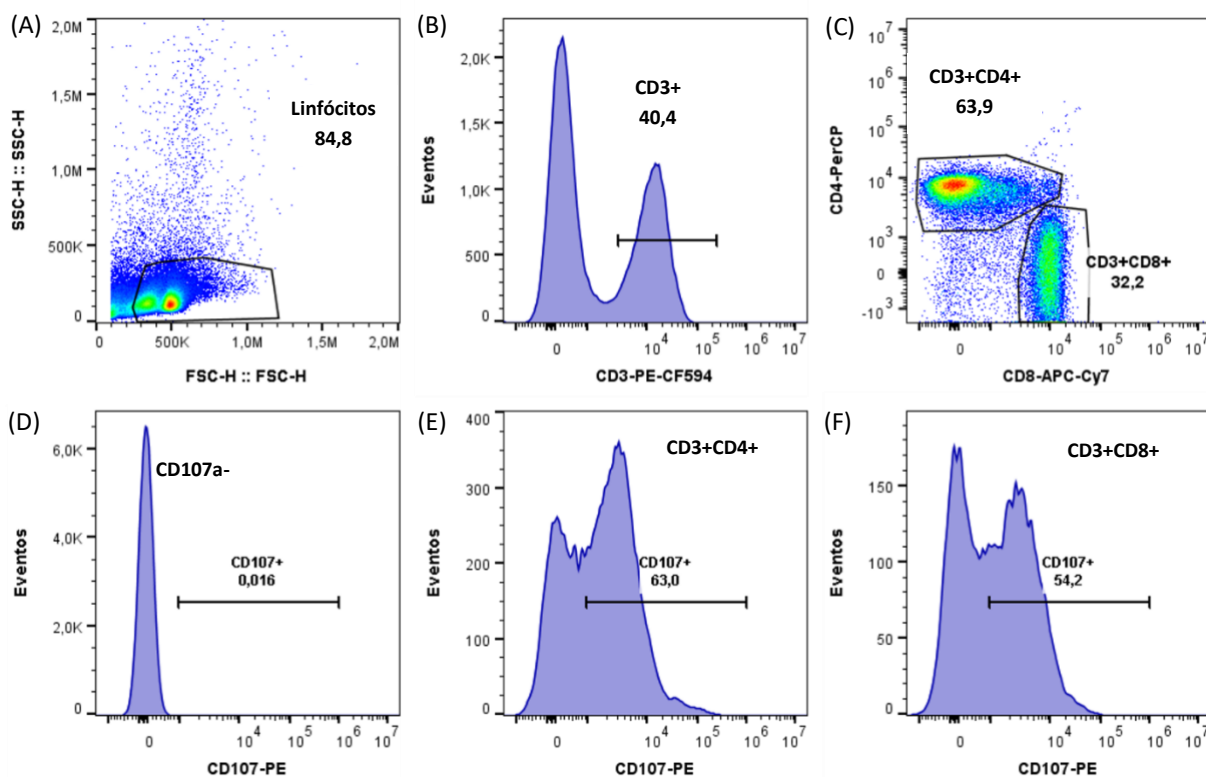


Figura 4.17: Estratégia de análise das populações de células T CD4+ e T CD8+ expondo CD107a. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c inoculados com pcTPA ou imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2, foram incubados por 4 horas com os peptídeos N67 ou controle e analisados por citometria de fluxo para identificação de populações de células T CD4+ e T CD8+ expondo CD107a. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 PE CF594, anti-CD4 PerCP, anti-CD8a APC-Cy7 e anti-CD107a PE. Primeiramente, a área de linfócitos foi setada em um gráfico de pontos (tamanho x granulosidade) (A) e

selecionada a partir de um *retrograde* da população CD3⁺ (B). As populações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ foram selecionadas a partir dessa região (C). A população de células não marcadas (D) foi utilizada para definir a frequência da população positiva para CD107a (linha CD107⁺). As populações CD107a⁺ foram selecionadas dentro das regiões CD3⁺CD4⁺ (E) e CD3⁺CD8⁺ (F). Acima um esquema representativo a partir de uma amostra de camundongo inoculado com pcTPA.

estabelecida

Não observamos diferenças significativas em relação às porcentagens de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ totais entre o grupo vacinado e controle (Figura 4.18), ou em relação à expressão de células T expressando CD107a (Figura 4.19).

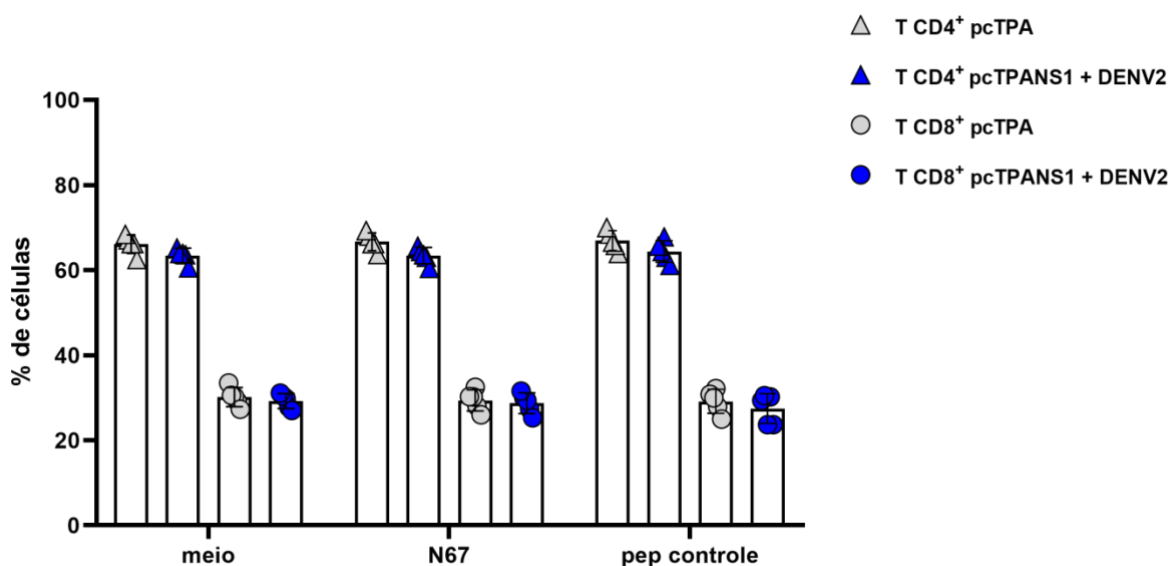


Figura 4.18: Porcentagens de células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais presentes nos baços de camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA. Esplenócitos de animais vacinados (símbolos azuis) ou controles (símbolos cinzas) foram coletados três dias após desafio do grupo vacinado e incubados por 4 horas com meio, peptídeo N67 ou controle. Triângulos representam células T CD3⁺CD4⁺ e círculos representam células T CD3⁺CD8⁺. O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

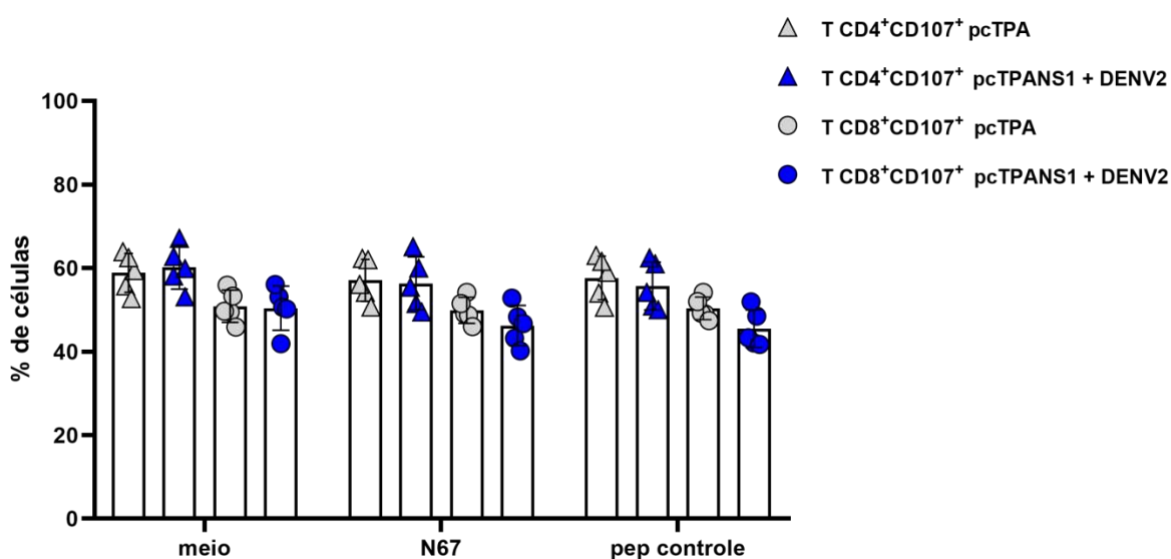


Figura 4.19: Porcentagens de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expondo CD107a em camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA. Esplenócitos de animais vacinados (símbolos azuis) ou controles (símbolos cinzas) foram coletados três dias após desafio do grupo vacinado e incubados por 4 horas

com meio, peptídeo N67 ou controle (²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³). Triângulos representam células T CD3+CD4+ e círculos representam células T CD3+CD8+. O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

De forma interessante, porém, observamos um decaimento na intensidade de fluorescência quando comparados os grupos vacinado e controle (Figuras 4.20 e 4.21), tanto na população T CD4+ quanto na população T CD8+, indicando uma menor quantidade de moléculas CD107a sendo expostas na superfície das células de animais vacinados que tiveram contato com o vírus. Em média, a intensidade de fluorescência das células T CD4+ expondo CD107a sofreu um decréscimo de 9 a 21% em relação às células T CD4+ oriundas de animais controle, o decréscimo sendo maior de acordo com o estímulo (meio < N67 < peptídeo controle). No caso de células T CD8+, essa intensidade sofreu um decréscimo de 18 a 25%, também variando com o estímulo. Quando comparados os grupos vacinado e controle, nós observamos diferenças estatísticas em todas as condições (com ou sem estímulo) (Figura 4.21).

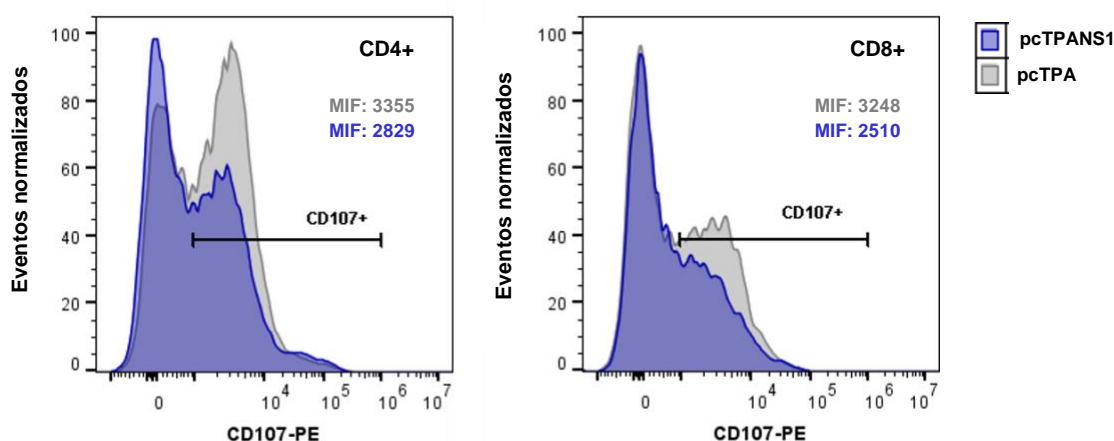


Figura 4.20: Intensidade de fluorescência de CD107a-PE das células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ em camundongos BALB/c inoculados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA. Esplenócitos de animais vacinados ou controles foram coletados três dias após o desafio viral do grupo vacinado e incubados por 4 horas com meio, peptídeo N67 ou peptídeo controle, analisados por citometria de fluxo para identificação de populações de células T CD4+ e T CD8+ expondo CD107a. Acima estão duas amostras representativas das populações CD3+CD4+CD107a+ (A) e CD3+CD8+CD107a+ (B). A população de células não marcadas (não mostrada) foi utilizada para definir a frequência da população positiva para CD107a (linha CD107+). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi obtida da população CD107a+. Amostras de camundongos vacinados estão representadas em azul, e amostras de animais controles estão representadas em cinza.

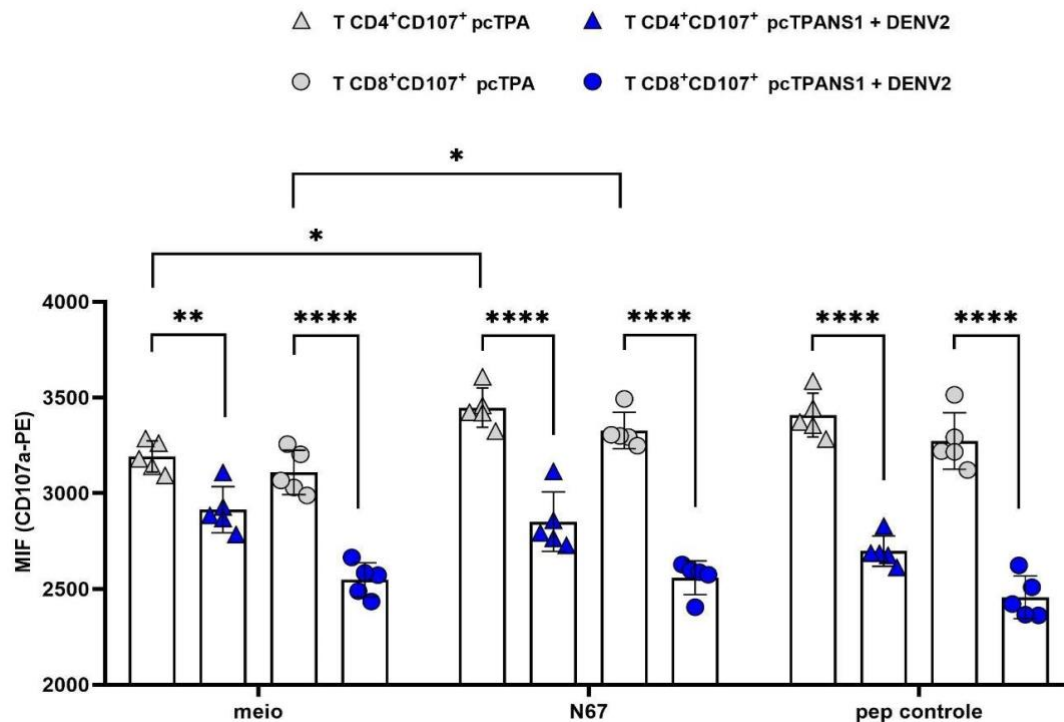


Figura 4.21: Média de intensidade de fluorescência de células T CD4+ e T CD8+ expondo CD107a em camundongos BALB/c inoculados com o plasmídeo pcTPANS1 ou pcTPA. Esplenócitos de animais vacinados (símbolos azuis) ou controles (símbolos cinzas) foram coletados três dias após desafio do grupo vacinado e incubados por 4 horas com meio, peptídeo N67 ou controle. Triângulos representam células T CD3+CD4+ e círculos representam células T CD3+CD8+. Os valores foram calculados a partir das médias geométricas das intensidades de fluorescência das amostras. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo teste *two-way* ANOVA seguido de teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

Analisamos os grupos separadamente de forma a avaliar a influência de cada condição de estímulo na exposição de CD107a. No grupo controle, observamos um aumento significativo na média de intensidade de fluorescência no caso de células T CD4+ incubadas com os peptídeos N67 e controle (Figura 4.22A), e também significativo no caso de células TCD8+ após incubação com o peptídeo N67 (Figura 4.22B). Em relação ao grupo vacinado, observamos um decaimento sutil após a incubação com os peptídeos NS1, sendo este decaimento apenas significativo no caso de células TCD4+ estimuladas com o peptídeo controle (Figura 4.22A).

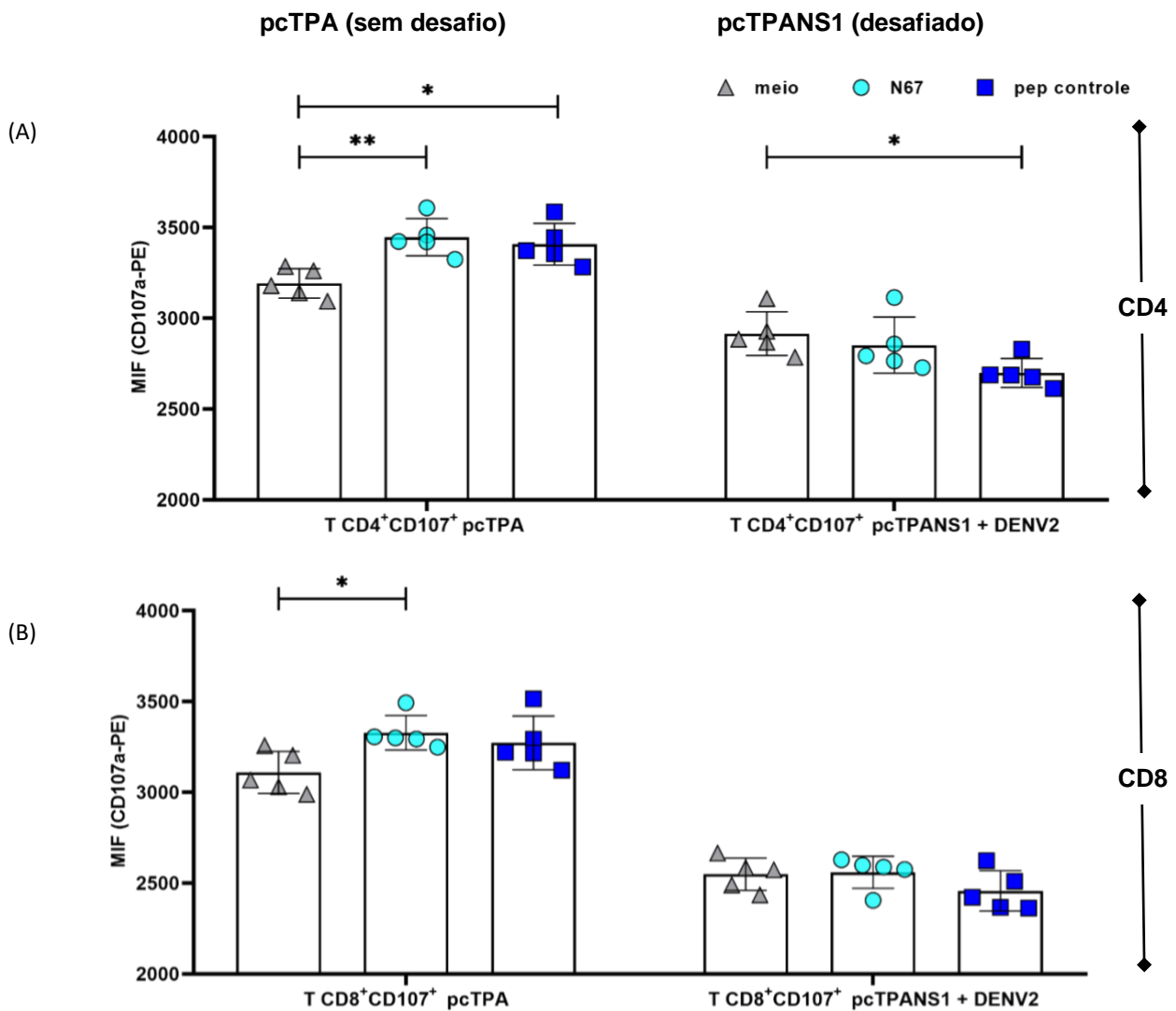


Figura 4.22: Média de intensidade de fluorescência de células T expondo CD107a após incubação com os peptídeos N67 e controle. Esplenócitos de animais vacinados ou controles foram coletados três dias após desafio do grupo vacinado e incubados por 4 horas com meio (triângulos cinzas), peptídeo N67 (círculos azuis claros) ou controle (quadrados azuis escuros). Células T CD4⁺ estão representadas em (A) e células T CD8⁺ estão representadas em (B). Os valores foram calculados a partir das médias geométricas das intensidades de fluorescência das amostras. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo teste não-paramétrico *two-tailed* Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

4.5 Identificação de peptídeos imunogênicos da proteína NS1 reconhecidos por células T de camundongos C57BL/6 vacinados com pcTPANS1

De forma a investigar possíveis diferenças na imunogenicidade gerada com a vacina pcTPANS1 devido à expressão diferencial de haplótipos MHC, nós comparamos as respostas de IFN- γ entre camundongos BALB/c e C57BL/6, frente ao estímulo com os peptídeos de NS1 da nossa biblioteca. As análises foram conduzidas através de ensaios de ELISPOT que seguiram os mesmos critérios descritos na seção 4.1: primeiramente através da avaliação dos peptídeos agrupados (*pools*) e posteriormente com os peptídeos individuais.

Conforme o parâmetro de positividade estabelecido como maior ou igual a 5 SFC/5x10⁵ células, consideramos como positivos os pools 1, 2, 4, 6 e 7 (Figura 4.23A). Após a análise com cada um dos peptídeos, observamos que os peptídeos N08, N16-18, N20, N33-36, N55-56 e N62 foram positivos, induzindo a produção de IFN- γ (Figura 4.23B).

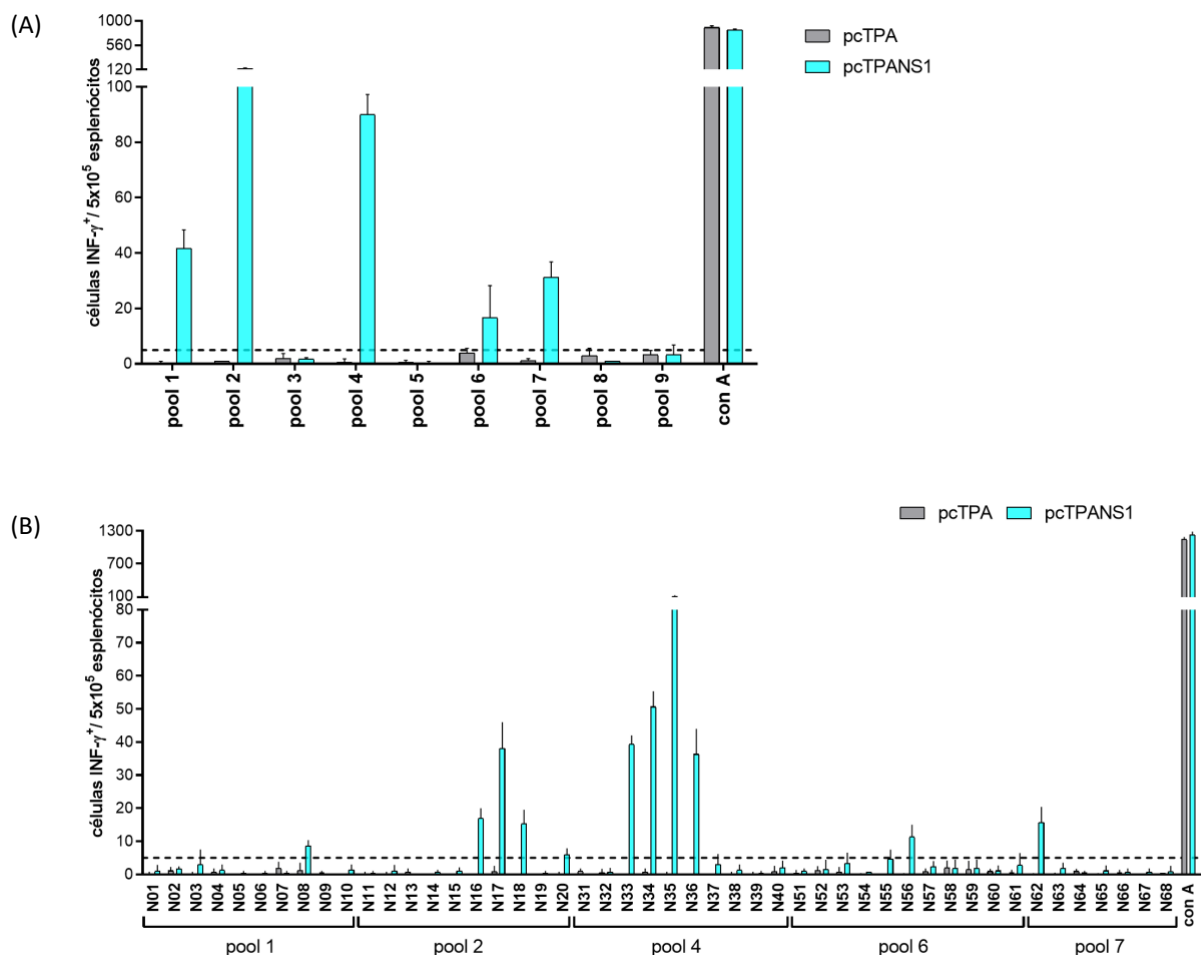


Figura 4.23: Produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos C57BL/6 estimulados com os peptídeos de NS1. Esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=3) foram incubados com os peptídeos NS1 por 18 horas, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ensaio ELISPOT. Os peptídeos foram analisados em *pools* (A) e selecionados para avaliação individual (B). Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA foram usadas como controle negativo. As linhas horizontais pontilhadas representam o ponto de *cutoff* de seleção (≥ 5 SFC/5x10⁵ células). Os gráficos representam os valores obtidos através de um experimento independente.

A partir desses resultados nós selecionamos os peptídeos N08, N17, N33, N35, N56 e N62 para os testes ELISPOT com células provenientes de camundongos individuais C57BL/6 (n=5). Os peptídeos N17, N35, N56 e N62 foram capazes de induzir a produção de IFN- γ significativamente mais alta em células isoladas de camundongos vacinados quando comparadas com as células provenientes do grupo controle, inoculado apenas com pcTPA (Figura 4.24). Vale ressaltar que o peptídeo N17 também se mostrou positivo nos ensaios com camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1.

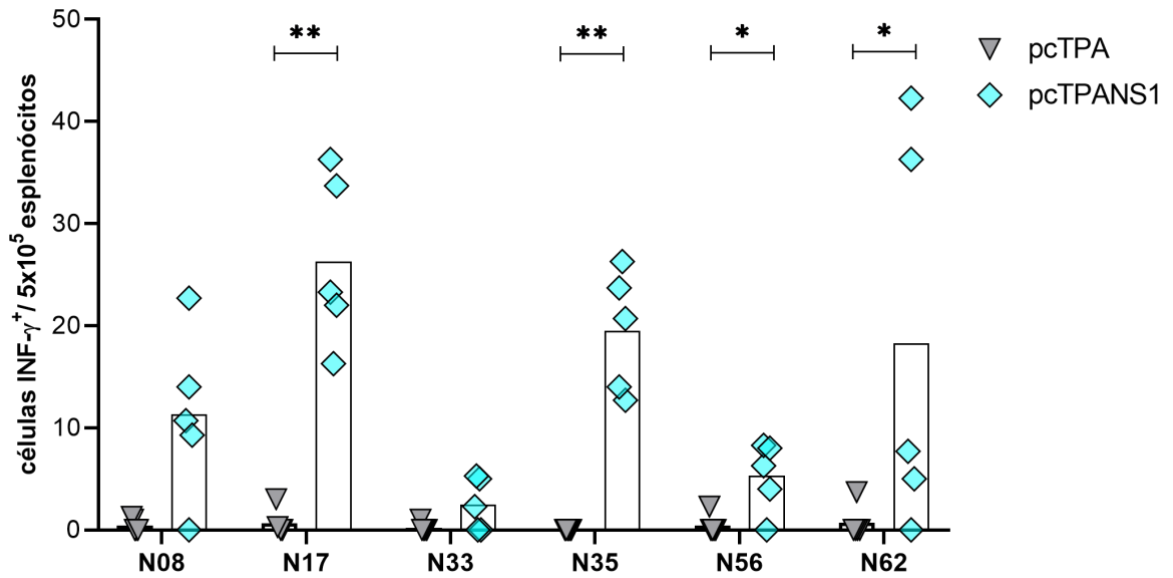


Figura 4.24: Produção de IFN- γ frente ao estímulo com os peptídeos de NS1 em células provenientes de camundongos C57BL/6 imunizados com pcTPANS1. Esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses de pcTPANS1 (n=5) foram incubados por 18 horas com os peptídeos de NS1 previamente selecionados, e o número de células produtoras de IFN- γ foi avaliado por ensaio de ELISPOT. Células isoladas de camundongos inoculados com pcTPA foram usadas como controle negativo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste Mann-Whitney *two-tailed* não-paramétrico (*p<0,05; **p<0,01). O gráfico representa os valores obtidos através de um experimento independente.

5. Discussão

A dengue é uma doença cuja incidência aumentou em aproximadamente trinta vezes ao longo das últimas décadas (WHO, 2014). Infelizmente, apesar dos esforços despendidos no controle de seu vetor *Aedes*, esta arbovirose permanece ainda de difícil prevenção (Gubler *et al.*, 2011). Completando este quadro, a única vacina licenciada, até o presente momento, no mercado apresentou resultados de eficácia pouco satisfatórios (Sabchareon *et al.*, 2012; Villar *et al.*, 2015). Alguns desafios se afiguram no desenvolvimento de uma vacina ideal contra a dengue, entre eles, a falta de uma correlação robusta e precisa entre proteção, anticorpos neutralizantes e resposta imune celular. Nosso grupo vem há algum tempo desenvolvendo vacinas de DNA contra dengue, uma estratégia vacinal que é capaz de induzir concomitantemente a resposta imune humoral e celular (Khan, 2013; Koide *et al.*, 2000; Saade & Petrovsky, 2012). Uma dessas vacinas de DNA baseada na proteína não-estrutural 1 do vírus do dengue tipo 2, pcTPANS1, foi o alvo deste estudo.

O presente trabalho visou à investigação do papel de células T CD4⁺ e T CD8⁺ na proteção conferida pela vacina pcTPANS1 em camundongos BALB/c desafiados com DENV2, a identificação de peptídeos imunodominantes da proteína NS1 reconhecidos por células T de animais imunizados com esta vacina e mapeados através da produção de IFN- γ e TNF- α , bem como a fenotipagem das células ativadas por esses peptídeos. A vacina de DNA pcTPANS1 foi previamente construída pelo nosso grupo e contém a sequência que codifica a proteína NS1 inteira de DENV2, cepa Nova Guiné, fusionada ao peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (TPA) e sob o controle do promotor do citomegalovírus humano (Costa *et al.*, 2006). O peptídeo sinal TPA foi utilizado visando à secreção da proteína recombinante e uma melhor indução da resposta imune, conforme observado anteriormente (Costa *et al.*, 2007). Além disso, nosso grupo constatou que o plasmídeo pcTPANS1 confere altas taxas de proteção frente ao desafio letal com DENV2 em nosso modelo murino (Costa *et al.*, 2006, 2007). A partir destes dados, o grupo vem se dedicando à investigação dos mecanismos imunes envolvidos na eficácia dessa vacina. Em um trabalho de Gonçalves e colaboradores (Gonçalves *et al.*, 2015) foi mostrado que anticorpos anti-NS1 gerados com a vacina pcTPANS1 são importantes na proteção conferida, juntamente com uma resposta imune celular.

A importância da resposta imune celular na proteção contra dengue vem sendo evidenciada em estudos recentes, principalmente devido aos baixos níveis de eficácia da vacina quimérica tetravalente desenvolvida pela Sanofi-Pasteur, Dengvaxia, licenciada no Brasil, México e Filipinas em 2015. Apesar da Dengvaxia possuir como esqueleto o vírus vacinal da febre amarela, vacina essa que apresenta altos níveis de sucesso em termos de proteção (Pulendran, 2009), a eficácia da vacina contra dengue se mostrou parcial nos estudos

clínicos, apresentando taxas de proteção que variaram aproximadamente de 30 a 60% dependendo do sorotipo (Sabchareon *et al.*, 2012; Villar *et al.*, 2015). Segundo estudos recentes, indivíduos soronegativos para dengue que recebem essa vacina possuem maiores riscos de hospitalização do que indivíduos soronegativos não-vacinados, independentemente da faixa etária (Halstead, 2017; Sridhar *et al.*, 2018). Uma vez que esta vacina leva à expressão somente das proteínas não-estruturais do vírus da febre amarela, foi sugerido que a falta da expressão das proteínas não-estruturais de DENV mediada pela vacina Dengvaxia possa ser em parte responsável pela falha na proteção, ocorrendo comprometimento das respostas de células T de memória contra os quatro sorotipos de dengue (Screaton *et al.*, 2015). De fato, resultados de um estudo compilatório sugerem que a Dengvaxia não induz respostas T CD8⁺ em indivíduos DENV-naïves, mas aumenta as respostas direcionadas contra a proteína NS3 em indivíduos que já tiveram contato com o vírus (Guy & Jackson, 2016).

Estudos realizados em humanos demonstraram que grande parte das células T ativadas por infecção por DENV são polarizadas para um fenótipo T auxiliares do tipo 1 (Hatch *et al.*, 2011). Tal fato também foi observado no soro de pacientes imunizados com uma vacina anti-DENV de vírus vivo-atenuado, TDV, onde as citocinas circulantes também se mostraram preferencialmente direcionadas para o perfil Th1 (Gwinn *et al.*, 2003). Em termos de estratégias vacinais, a ativação de células T CD4⁺ auxiliares e sua cooperação com células B é um dos principais mecanismos buscados para o sucesso da proteção contra a dengue, uma vez que anticorpos neutralizantes, direcionados principalmente contra a proteína do envelope viral, são ditos como essenciais para a prevenção da infecção (Screaton *et al.*, 2015; St John & Rathore, 2019).

Por outro lado, nosso grupo demonstrou, através de experimentos de transferência adotiva de células, que a administração conjunta de células T CD4⁺ e anticorpos anti-NS1 de animais imunizados com a vacina pTPANS1 foi capaz de proteger camundongos contra um desafio letal com DENV-2 (Gonçalves *et al.*, 2015). Em concordância com o papel protetor desempenhado por células T, Hatch e colaboradores realizaram um estudo em crianças tailandesas apresentando infecções subclínicas, onde observaram frequências aumentadas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dengue-específicas nesse grupo em comparação com pacientes que sofreram infecções secundárias sintomáticas (Hatch *et al.*, 2011).

O estudo dessa dissertação foi conduzido em um modelo de camundongo imunocompetente: camundongos BALB/c inoculados pela via intracerebral com uma cepa de DENV2 neuroadaptada (NGC). Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo foi observado que a inoculação por via intracerebral dessa cepa é capaz de ocasionar a dispersão

do vírus acarretando efeitos sistêmicos (Oliveira *et al.*, 2016b). Partículas de DENV2 infecciosas foram detectadas no cérebro e soro dos camundongos infectados. Além disso, o fígado também foi identificado como um órgão alvo da replicação viral nestes animais, com a detecção da proteína NS3 em hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais. O mesmo estudo também mostrou a ativação de células T através da detecção do marcador CD45Rb_{low} em amostras coletadas do fígado, baço e soro dos animais infectados, bem como um aumento nos níveis séricos de IL-12p70, TNF- α , MCP-1 e IFN- γ após a inoculação de DENV2 (Oliveira *et al.*, 2016b).

No presente estudo observamos que a imunização com a vacina pcTPANS1 foi capaz de induzir respostas de células T com a produção de IFN- γ frente à uma biblioteca de peptídeos contidos na proteína NS1. A triagem desses peptídeos foi realizada através da avaliação da produção dessa citocina por meio de ensaios de ELISPOT e ICS. Nós identificamos 3 peptídeos imunogênicos capazes de estimular a produção de IFN- γ em camundongos vacinados com pcTPANS1 sem o desafio com DENV2, N17, N46 e N67, e outros 4 peptídeos capazes de produzir respostas significativas após a infecção viral, N12, N14, N35 e N41. O peptídeo N67 ($_{265}AGPWHLGKLEMDDF_{279}$) se revelou como o mais imunodominante dentre os identificados, induzindo os maiores níveis de produção de IFN- γ nos ensaios de ELISPOT realizados com estimulação de 18 horas, assim como nos experimentos de ICS com estímulo de 6 horas.

Um epítipo menor contido dentro do peptídeo N67 ($_{265}AGPWHLGKL_{273}$) foi descrito anteriormente em um estudo conduzido em camundongos BALB/c imunizados com uma vacina baseada em adenovírus contendo o gene NS1 de DENV2 (Gao *et al.*, 2008). Em tal estudo os autores identificaram este epítipo como específico para células T CD8 e altamente conservado entre os quatro sorotipos de DENV. Outros estudos também identificaram epítipos contidos nas sequências dos peptídeos N17/N18, N41, N48 e N67 (Duan *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2013; Rivino *et al.*, 2013; Weiskopf *et al.*, 2014, 2015a), evidenciando a importância desses peptídeos na resposta antiviral. A capacidade protetora desempenhada por epítipos conservados já foi demonstrada por Weiskopf e colaboradores, através de um estudo onde indivíduos imunizados com a vacina TetraVax desenvolveram respostas de células T predominantemente direcionadas contra epítipos conservados de proteínas não estruturais, epítipos esses que foram capazes de estimular respostas multifuncionais, incluindo citotóxicas (Weiskopf *et al.*, 2015a). Essa vacina é uma formulação tetravalente de vírus quimérico atenuado através da deleção de 30 nucleotídeos na região 3' não-traduzida (UTR) do genoma viral de cada um dos sorotipos de DENV,

construída pelo NIAID conforme mencionado na Introdução deste trabalho (Kirkpatrick *et al.*, 2015).

Nossos resultados de ICS demonstraram um maior percentual de células T expressando IFN- γ provenientes de camundongos vacinados com pcTPANS1 antes do desafio viral, quando estimuladas com os peptídeos de NS1 selecionados, principalmente em relação às células T CD4⁺IFN- γ ⁺. Avaliamos a produção dessa citocina no sétimo dia após desafio viral, uma vez que no nosso modelo animal este é o dia em que camundongos começam a apresentar sinais de morbidade, sendo também o dia no qual os níveis séricos de IFN- γ atingem o seu pico (Oliveira *et al.*, 2016b). Em concordância com esses resultados, um estudo anterior do nosso grupo observou que camundongos BALB/c vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 e desafiados com DENV2 apresentaram níveis menores de IFN- γ e IL-12p70 circulantes no soro nos estágios tardios de infecção (a partir do sétimo dia após o desafio viral) quando comparado com os animais não-vacinados (Oliveira *et al.*, 2016a). Além disso, foi observada uma maior ativação de células T em camundongos vacinados e desafiados com DENV2 a partir do sétimo dia após infecção, em contraposição a camundongos não vacinados, onde essa ativação decresceu a partir do quinto dia (Oliveira *et al.*, 2016a). Essa ativação, avaliada pela menor expressão do marcador CD45Rb_{low} em células T CD4⁺ e T CD8⁺, se mostrou correlacionada à ausência de sinais de morbidade, o que sugere que a vacinação com o plasmídeo pcTPANS1 controla o aumento dos níveis mais exacerbados de algumas citocinas geradas pela infecção, ao menos no modelo de estudo em questão.

Já foi observado que a produção de IFN- γ é pronunciada entre indivíduos com infecções secundárias subclínicas de DENV (Hatch *et al.*, 2011; Mangada *et al.*, 2002; Simon-Lorière *et al.*, 2017). O IFN- γ é uma citocina importante tanto na resposta imune inata quanto adaptativa no caso de infecções virais, sendo fundamental para a função citotóxica de células T CD8⁺, assim como na ativação de células T CD4⁺ auxiliares (Wakil *et al.*, 1998). Uma alternativa que talvez explique a observação de maiores frequências de IFN- γ em pacientes com quadro clínico grave de dengue, em estudos mais antigos, seria a produção precoce e descontinuada dessa citocina nesses indivíduos (Green *et al.*, 1999; Libraty *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, é possível que a produção precoce de IFN- γ seja ocasionada por outras células que não linfócitos T, uma vez que existem evidências do papel protetor dessa citocina. Singla e colaboradores observaram que IFN- γ , IFN- α , IL-7, IL-12p70, MCP-1 e outras citocinas de perfil Th1 se mostraram em níveis mais baixos em casos graves de pacientes com infecção secundária (Singla *et al.*, 2016). Em concordância com o papel protetor do IFN- γ , indivíduos vacinados com a vacina TDV contra dengue apresentaram a

produção sustentada dessa citocina, associada à proteção contra DENV (Gunther *et al.*, 2011). Outro estudo correlacionou maiores níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produzindo IFN- γ no soro de pacientes DENV-ímmunes que subsequentemente passaram por uma infecção secundária sem sinais clínicos (Hatch *et al.*, 2011). No caso de infecções secundárias em humanos, portanto, o fator protetor determinante parece estar na produção sustentada dessa citocina.

Além de investigarmos a produção de IFN- γ neste trabalho, nós também avaliamos a porcentagem de células T produtoras de TNF- α em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados e estimulados com a nossa biblioteca de peptídeos NS1 através de ensaios ICS. O TNF- α é uma citocina importante no contexto da patologia da dengue, uma vez que níveis elevados de TNF- α e de receptores solúveis de TNF- α foram relatados em casos de hospitalização por dengue grave e associados ao desenvolvimento das formas graves da doença durante infecções secundárias (Braga *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1999; Mangada *et al.*, 2002). Além dessa citocina estar envolvida no processo de apoptose, inflamação e aumento da permeabilidade celular, o TNF- α também induz a expressão do fator tecidual (fator III/tromboplastina) que inicia a cascata de coagulação, mecanismos estes alterados em pacientes com casos graves de dengue (Mangada & Rothman, 2005; Srikiatkachorn *et al.*, 2017).

No nosso estudo, observamos um aumento significativo na produção de TNF- α apenas na população de células T CD8⁺ estimulada com o peptídeo N67 dos esplenócitos isolados de camundongos vacinados com pcTPANS1, quando comparado com as células isoladas dos animais inoculados com o plasmídeo controle pcTPA. De forma geral, a expressão de TNF- α se manteve inalterada após o desafio viral, exceto nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ estimuladas com os peptídeos N17 e N67, respectivamente. Se considerarmos o aumento nos níveis de TNF- α como um efeito deletério causado pela infecção por DENV, os nossos resultados sugerem uma proteção conferida por essa vacina através da inibição do aumento dos níveis dessa citocina. Em um estudo anterior, nosso grupo mostrou que os camundongos infectados com DENV2 por via i.c. apresentaram um aumento nos níveis séricos de TNF- α tanto no início da infecção quanto em um período mais tardio (24 horas e 7 dias pós desafio viral) (Oliveira *et al.*, 2016a), o que corrobora com os nossos resultados indicando que a vacina pcTPANS1 é protetora.

Em contrapartida, outra vacina de DNA construída pelo nosso grupo e baseada no ectodomínio da proteína do envelope viral, pE1D2 (Azevedo *et al.*, 2011), gerou resultados diferentes quando avaliamos a expressão de TNF- α em esplenócitos de camundongos vacinados, coletados antes e após o desafio com DENV2. Neste caso, observamos um

aumento significativo da produção de TNF- α após o desafio viral (Pinto *et al.*, 2019). Tais resultados sugerem que as duas vacinas de DNA, pcTPANS1 e pE1D2, atuam de modo distintos na proteção contra DENV2, fato que pode ser explicado pelos próprios mecanismos intrínsecos de uma resposta imune contra proteínas estruturais versus proteínas não-estruturais. Um estudo realizado por Weiskopf e colaboradores detectou apenas 10 a 30% das respostas celulares direcionadas contra proteínas estruturais em um cenário após vacinação contra dengue (Weiskopf *et al.*, 2015a). Por outro lado, outros estudos realizados tanto em indivíduos infectados quanto em camundongos desafiados observaram que o direcionamento das respostas de células T depende do sorotipo de DENV (Ngono *et al.*, 2016; Weiskopf *et al.*, 2015b).

Quanto à correlação do aumento da expressão de TNF- α com a patogênese da dengue, Mangada e Rothman observaram uma proporção maior de células T CD4+ produtoras de TNF- α do que de produtoras de IFN- γ após estímulo com sorotipos de DENV heterólogos, sugerindo uma alteração no balanço de citocinas em casos de infecção secundária e possivelmente um fator de risco para o desenvolvimento de formas graves de dengue (Mangada & Rothman, 2005). Entretanto, estudos recentes não identificaram aumento significativo dos níveis de TNF- α em casos de pacientes com formas graves de dengue. No estudo de Simon-Lorière e colaboradores (Simon-Lorière *et al.*, 2017), realizado com crianças do Camboja, não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 entre o grupo virêmico assintomático e pacientes com dengue com sinais clínicos. Em outro estudo, foi observado apenas um aumento marginal nos níveis de TNF- α entre infecções secundárias e primárias, diferença essa que não foi estatisticamente significativa (Singla *et al.*, 2016). Singla e colaboradores observaram uma correlação entre a gravidade da infecção por dengue e o aumento dos níveis de IL-8, IL-6, IL-10 e MCP-1, juntamente com o decréscimo nos níveis de IFN- α , IL-7, IL-12p70 e sCD40L (Singla *et al.*, 2016). É possível que a avaliação da produção de citocinas isoladas não seja o método mais indicado. De fato, a análise da produção de citocinas múltiplas nas respostas de células T anti-DENV têm sido um marco importante na literatura, como evidenciado em trabalhos que observaram um papel protetor para células T produtoras de IFN- γ em conjunto com TNF- α (Hatch *et al.*, 2011; Yauch *et al.*, 2009).

Uma vez que ao papel protetor ou patogênico desempenhado por células T ainda permanece em debate, as análises de células polifuncionais podem representar um aspecto importante para a avaliação do controle viral. O número de trabalhos investigando o papel das respostas de células T polifuncionais vem aumentando ao longo dos últimos anos, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas contra flavivírus (Campos

et al., 2018). Estes trabalhos sugerem que linfócitos produtores de múltiplas citocinas incluindo IFN- γ , TNF- α , e IL-2, assim como aqueles que expressam indicativos de citotoxicidade como CD107a, são as células mais efetivas em controlar a infecção viral, impedindo o progresso da doença para as suas formas mais graves (Hatch *et al.*, 2011; Weiskopf *et al.*, 2013; Yauch *et al.*, 2009). Da mesma forma, um estudo sugeriu que células T expressando baixos níveis do marcador de degranulação CD107a e altos níveis de citocinas inflamatórias estejam associadas ao desenvolvimento de formas graves de dengue durante infecção primária ou secundária, enquanto que altos níveis de expressão de CD107a estão associados a um melhor prognóstico da doença (Duangchinda *et al.*, 2010). Em contraponto a essa hipótese, foi observado que a ativação do receptor TCR está correlacionada com a relação hierárquica: MIP1 β > degranulação > TNF- α > IFN- γ , onde baixos níveis de estimulação do receptor TCR são suficientes para a secreção de MIP1 β enquanto que a produção de IFN- γ requer maiores níveis de estimulação (Friberg *et al.*, 2011). Desse modo, a natureza do epítipo influencia na qualidade da resposta e um melhor engajamento do TCR implica em uma melhor ativação de células T. De fato, uma das metas do nosso projeto no futuro será investigar o perfil funcional das células ativadas pelos peptídeos NS1 selecionados.

Sabe-se que a ligação peptídeo-MHC e sua interação com o TCR é fundamental para a geração de uma resposta de células T (Yachi *et al.*, 2006). Uma ativação efetiva de células T requer a cooperação entre os co-receptores CD4 e CD8 que contribuem para a estabilização do complexo peptídeo-MHC-TCR ao modular a sinalização e consequentemente a fosforilação do complexo. Tal fator depende da velocidade do alinhamento próprio do TCR e seu co-receptor na superfície da célula. Mudanças estruturais no complexo peptídeo-MHC podem desencadear alterações nesse alinhamento do TCR e seu co-receptor na membrana celular, dificultando ou facilitando a interação entre os dois. Foi observado que ligantes mais fortes estimulam uma ligação mais rápida entre TCR e CD8, e consequentemente, um recrutamento mais rápido da proteína kinase ERK fosforilada (pERK) para a sinapse imune (Yachi *et al.*, 2006).

No nosso trabalho, utilizamos peptídeos de 15 aminoácidos de comprimento, de forma a alcançar tanto a ativação de células T CD8⁺ quanto de células T CD4⁺. Peptídeos de 15 aminoácidos são suficientes para a detecção de respostas T CD8⁺ e também de células T CD4⁺, apesar de concentrações até dez vezes menores de peptídeos de 9 aminoácidos de comprimento serem capazes de estimular respostas dos linfócitos T CD8⁺ (Kiecker *et al.*, 2004). Portanto, para a triagem de epítipos e o monitoramento de respostas T CD4⁺ e CD8⁺

ao mesmo tempo, o uso de peptídeos de 15 aminoácidos de comprimento é indicado (Kiecker *et al.*, 2004) e foi a metodologia que adotamos neste trabalho.

Em estudos anteriores do nosso grupo, camundongos BALB/c vacinados com o pcTPANS1 foram depletados de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ dias antes do desafio letal com DENV2. Foi observado que a depleção de células T CD8⁺ causou uma queda na taxa de sobrevivência dos animais de 80% para 50%, enquanto que a depleção de células T CD4⁺ impactou em uma taxa de sobrevivência de 10%, proporção essa igual àquela observada no grupo controle de animais desafiados com dengue mas que não haviam sido vacinados (Gonçalves *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2019). Sendo assim, as células T CD4⁺ parecem ser fundamentais na eficácia da vacina pcTPANS1. Levando em consideração que a depleção de células T CD8⁺ não impacta na proteção de forma tão drástica como a depleção de células T CD4⁺, resolvemos investigar se estas células T CD4⁺ poderiam estar desempenhando um papel citotóxico na proteção conferida pela nossa vacina.

Com o objetivo, portanto, de identificar respostas T citotóxicas, CD4 positivas e/ou CD8 positivas, realizamos o ensaio para avaliação de citotoxicidade *in vivo*, utilizando os quatro peptídeos anteriormente identificados como capazes de estimular respostas IFN- γ ⁺ de maior magnitude: N14, N17, N35 e N67. O racional do ensaio seria que, ao transferirmos esplenócitos pulsados com tais peptídeos, a atividade citotóxica seria facilitada no caso de camundongos anteriormente imunizados com pcTPANS1, uma vez que estes já teriam desenvolvido uma resposta de células T de memória contra esses epítomos. Contrariamente ao que esperávamos, não observamos diferenças significativas entre o grupo vacinado (pcTPANS1) e não-vacinado (pcTPA) nos percentuais de lise de células alvos apresentando os peptídeos selecionados. Surpreendentemente, o peptídeo N14 estimulou uma taxa de lise celular inferior àquela espontânea, naturalmente observada. Os grupos que receberam as células pulsadas com o peptídeo N67 apresentaram as maiores taxas de lise, entretanto essas taxas foram baixas (aproximadamente 15% para o grupo controle e 17% para o grupo vacinado).

Uma das hipóteses levantadas pelo grupo a respeito do baixo nível de citotoxicidade observado neste experimento foi a diferença na apresentação dos peptídeos pelas células alvos para os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺. Como os peptídeos da nossa biblioteca possuem 15 aminoácidos de comprimento, é possível que as taxas observadas de lise celular tenham sido induzidas apenas pela atividade de células T CD4⁺ com pouca eficiência e os peptídeos não tenham sido capazes de estimular células T CD8⁺ em uma magnitude suficiente para apresentarem um perfil citotóxico, apesar de termos observado que tanto as células T CD4⁺ quanto as T CD8⁺ foram estimuladas para a produção de IFN- γ e TNF- α . De fato, Kiecker e

colaboradores (Kiecker *et al.*, 2004) sugerem a utilização de peptídeos de 15 aminoácidos para a triagem de respostas T CD8+, e a utilização de peptídeos de 9 ou 10 aminoácidos para a quantificação das respostas.

De forma a sanar essa dúvida, repetimos o ensaio de citotoxicidade *in vivo* utilizando o peptídeo N67 e o peptídeo controle AGPWHLGKL anteriormente mencionado, cuja sequência está contida dentro do nosso peptídeo N67, descrito na literatura como específico de células T CD8+ (Gao *et al.*, 2008). Esse peptídeo de 9 aminoácidos foi utilizado em ensaios anteriores do grupo, sendo capaz de induzir uma porcentagem de lise celular de 80% e 20% em camundongos imunizados com pcTPANS1 ou inoculados com o plasmídeo controle pcTPA, respectivamente (Gonçalves *et al.*, 2015).

De fato, em concordância com os estudos anteriores, observamos um percentual de citotoxicidade de quase 100% nos camundongos vacinados com o pcTPANS1 que receberam os esplenócitos pulsados com o peptídeo controle, apresentando uma taxa de lise celular de aproximadamente 97%. A taxa de lise celular também foi alta em camundongos não-vacinados que receberam a mistura celular contendo esse peptídeo pulsado (aproximadamente 50%), observação essa que pode ser explicada pelo fato de que todos os camundongos, vacinados e controles, foram submetidos ao desafio letal com DENV2 quatro dias antes ao experimento. Independentemente, observamos que os camundongos vacinados apresentaram uma porcentagem de citotoxicidade significativamente e quase duas vezes maior do que os animais que receberam o plasmídeo pcTPA, confirmando a eficiência da vacina pcTPANS1 em gerar células citotóxicas contra o peptídeo em questão. Entretanto, as taxas de lise celular induzidas pelo nosso peptídeo controle foram consideravelmente maiores em comparação com aquelas induzidas pelo peptídeo N67, aproximadamente 32% no grupo vacinado e 24% no grupo controle. Estes resultados sugerem que os peptídeos de menor comprimento, e seguramente ativadores de células T CD8+, desempenham um melhor papel na estimulação de um perfil citotóxico avaliada por este tipo de ensaio.

Porém, como anteriormente citado, observamos a ativação de células T CD8+ com os peptídeos de 15 aminoácidos acarretando na produção de IFN- γ e TNF- α por ensaios ICS, embora o período de interação dos esplenócitos com os peptídeos, apresentação e estimulação tenha sido consideravelmente diferente: 6 horas de incubação com o peptídeo, apresentação e estimulação nos ensaios ICS contra apenas 45 minutos de incubação do peptídeo com as células alvos e posterior estimulação nos camundongos, nos ensaios de citotoxicidade *in vivo*. Sabe-se da literatura que é possível a apresentação de antígenos exógenos para células T CD8+ através da ligação de peptídeos a moléculas de MHC-I vazias na superfície da célula (Cruz *et al.*, 2017), e apesar da limitação da fenda da molécula de MHC-I favorecer a ligação

de peptídeos de até 9 aminoácidos de comprimento, a molécula pode ocasionalmente acomodar peptídeos maiores desde que as extremidades destes se acomodem para fora da fenda (Diegel *et al.*, 2003). Essa ligação à molécula de MHC-I, entretanto, pode ocorrer após um processamento extracelular liderado por proteases (ou peptidases) envolvidas no “clipping” de peptídeos mais longos, efetivamente eliminando porções amino-terminais que impeçam a ligação do complexo peptídeo-MHC e o seu ligante cognato na molécula TCR, permitindo assim a estimulação direta de células T (Diegel *et al.*, 2003; Kiecker *et al.*, 2004).

Supondo que processos de apresentação de antígeno mais eficientes para peptídeos maiores que 9 aminoácidos requeira um tempo maior para a sua execução, decidimos realizar mais um ensaio de citotoxicidade *in vivo*, dessa vez incubando os esplenócitos com os peptídeos N67 e controle por 6 horas. Infelizmente, não detectamos diferenças na porcentagem de lise celular entre os animais vacinados e controles neste último ensaio. Antes da transferência de células observamos uma grande porcentagem de células mortas após o período de 6 horas de incubação com os peptídeos, fato este que provavelmente diminuiu a capacidade/quantidade de células apresentadoras de antígeno necessárias para a ativação da resposta citotóxica nos camundongos recipientes.

De uma forma semelhante a esse tipo de ensaio, investigamos a atividade citotóxica induzida pelos nossos peptídeos de NS1, dessa vez através de experimentos *in vitro* por meio da marcação de CD107a e granzima B, bem como CD3, CD4 e CD8 para fenotipagem das células citotóxicas. Como anteriormente citado, já foi observada uma correlação do desenvolvimento de formas graves de dengue com uma resposta celular alta em liberação de citocinas, entretanto baixa no percentual de células T expressando CD107a (Duangchinda *et al.*, 2010). A molécula CD107a é um marcador de degranulação que é expresso na superfície celular após o transporte de grânulos líticos até a sinapse imune. Esses grânulos contêm perforina e granzimas e são envolvidos por uma bicamada lipídica que contém glicoproteínas associadas ao lisossomo (LAMPs), incluindo CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) e CD63 (LAMP-3), que se tornam transientemente expressos na superfície celular após exocitose do grânulo (Fukuda, 1991; Peters *et al.*, 1991; Stinchcombe *et al.*, 2001). Sendo assim, combinado com a detecção da expressão de granzima ou perforina, a marcação de CD107 é utilizada como parâmetro para citotoxicidade (Betts *et al.*, 2003).

Nesse sentido, realizamos um experimento piloto onde estimulamos esplenócitos de camundongos imunizados com pcTPANS1 ou inoculados com pcTPA com o peptídeo N67 e o peptídeo controle AGPWHLGKL por 4 horas, procedendo após esse período com a marcação extracelular de CD107a, CD3, CD4 e CD8, e então a marcação intracelular de granzima B (dado não apresentado). A marcação de granzima B não foi positiva na leitura

no citômetro, fenômeno este que aconteceu em vezes anteriores em testes para titulação do anticorpo, onde mudamos uma série de variáveis para tentar obter positividade na marcação dessa molécula, entre elas, tempo de estímulo, molécula de estímulo e lote de brefeldina A. Infelizmente, nenhuma destas variáveis fez qualquer diferença, e pensamos que o anticorpo utilizado neste estudo não estaria funcional.

Quanto à marcação da molécula CD107a, não observamos diferenças estatísticas nas porcentagens de células T CD3+CD4+ ou T CD3+CD8+ expressando essa molécula frente aos diferentes peptídeos, nem no grupo vacinado e infectado com DENV2, nem no grupo de animais apenas inoculados com o plasmídeo controle pcTPA. A única diferença notável ocorreu em termos de média de intensidade de fluorescência, uma vez que células T tanto CD3+CD4+ quanto CD3+CD8+ de animais vacinados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 apresentaram uma diminuição na intensidade de fluorescência da molécula CD107a em comparação com as células T oriundas dos animais inoculados apenas com o plasmídeo controle. A existência do vírus e/ou de uma prévia imunização parece ter sido o principal fator para essa diferença, mas podemos também observar uma diminuição na intensidade de fluorescência proporcional à incubação com os peptídeos N67 e controle, sendo essa diminuição maior no caso da incubação com este último. Este fato é interessante, uma vez que o peptídeo controle foi o que induziu maior citotoxicidade *in vivo*, parecendo haver, portanto, uma correlação entre a diminuição da quantidade de moléculas CD107a expostas na superfície da célula (diminuição da intensidade de fluorescência) e uma atividade citotóxica. Entretanto, não encontramos na literatura nenhum trabalho que correlacione exaustão da molécula CD107a e atividade citotóxica positiva.

É possível que os métodos empregados neste trabalho não tenham facilitado a detecção de respostas citotóxicas. Já foi visto que, em contraste com células T CD4+ citotóxicas circulantes no sangue, o potencial citolítico dessas células é limitado em tecidos linfóides. Observou-se que moléculas efetoras incluindo INF- γ , perforina e β -quimiocinas são pouco expressas em células T CD4+CD107a+ confinadas nos linfonodos (Buggert *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados em relação a células T CD8+ (Reuter *et al.*, 2017).

A investigação do potencial citotóxico das células T estimuladas pelos peptídeos de NS1 da nossa biblioteca é de interesse para o nosso grupo, uma vez que diversos estudos apontam para o papel direto de células T CD4+ na lise de células infectadas através da observação de atividade citotóxica associada com proteção contra dengue (Duangchinda *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2016; Weiskopf *et al.*, 2015c). O papel das respostas T CD8+ contra a dengue já está mais estabelecido na literatura: essas células foram demonstradas como

essenciais para proteção antiviral em associação com a produção de INF- γ , no contexto de alelos específicos de HLA que induzem respostas polifuncionais (Yauch *et al.*, 2009; Weiskopf *et al.*, 2013), como também no contexto de epítomos conservados entre os sorotipos de dengue (Ngono *et al.*, 2016; Weiskopf *et al.*, 2015a).

Alguns estudos destacaram o papel de células T CD8⁺ como um dos principais agentes para o *clearance* viral em um modelo de camundongo humanizado, onde os autores concluíram que células T CD4⁺ não são necessárias para o controle de infecção primária de DENV (Yauch *et al.*, 2009, 2010). Segundo esse modelo murino deficiente em IFN do tipo I, a depleção de células T CD4⁺ não afetou a carga viral ou os títulos de anticorpos IgG e IgM DENV-específicos (Yauch *et al.*, 2009). Entretanto, é necessário apontar o papel comprovado das respostas T CD4⁺ auxiliares como fundamentais para a indução, maturação e troca de classe de anticorpos, bem como o desenvolvimento de células B de memória e a regulação da magnitude e qualidade das respostas de células T antivirais (Mangada & Rothman, 2005; McKinstry *et al.*, 2010). A importância de células T CD4⁺ induzidas pela vacina pcTPANS1 em um modelo de camundongo imunocompetente já foi previamente relatada pelo nosso grupo (Gonçalves *et al.*, 2015). Outro dos nossos estudos também demonstrou uma forte resposta T CD4⁺ após vacinação com o pcTPANS1 seguida de desafio viral (Oliveira *et al.*, 2016a). A porcentagem de ativação desse subtipo celular foi de 30% no baço e 80% no soro, contra 5% de ativação de células T CD8⁺, avaliada pelo marcador CD45Rb, resposta essa associada com ausência de sinais de morbidade durante a infecção (Oliveira *et al.*, 2016a).

Já foi sugerido em modelos de infecção que utilizam camundongos deficientes em IFN do tipo I que a geração de respostas de células T CD4⁺ é comprometida, uma vez que esse tipo de interferon é necessário para a mudança de classe de anticorpos bem como para a ativação de células dendríticas (Jego *et al.*, 2003; Le Bon *et al.*, 2001). Essas células não só ativam células T CD4⁺ como também promovem o “*cross-priming*” de células T CD8⁺. Esse processo torna capaz a apresentação de antígenos exógenos via MHC-I e a estimulação de respostas T CD8⁺ mais eficientes, sendo um processo fundamental no controle de tumores (Cruz *et al.*, 2017; You *et al.*, 2017). Nesse processo, antígenos solúveis em um fluido extracelular são internalizados por mecanismos de endocitose para dentro do citosol onde ficam suscetíveis à hidrólise pelo proteassoma e à maquinaria de transporte ao MHC-I (Cruz *et al.*, 2017). É possível, portanto, que essas células possuam um papel significativamente mais relevante em humanos e modelos não deficientes em IFN do tipo I.

Um estudo recente realizado com indivíduos infectados com DENV assintomáticos observou um aumento na porcentagem de células T CD4⁺ e uma diminuição de células T

CD8⁺ comparado com pacientes que apresentaram sinais clínicos de infecção por DENV, onde a proporção CD4/CD8 foi invertida (Simon Loriere *et al.*, 2017). Nesse mesmo sentido, vários alelos HLA foram associados a um aumento do risco de formas graves de dengue e de respostas T CD8⁺ mais fracas (Weiskopf *et al.*, 2013), enquanto alelos restritos a células T CD4⁺, como por exemplo, os alelos HLA-DRB1, foram associados com casos menos graves de infecção por DENV e maiores magnitudes de respostas T CD4⁺, o que sugere novamente que essas células possuem um papel importante na proteção contra o vírus (Weiskopf *et al.*, 2016).

Trabalhos recentes vêm explorando a associação de células T CD4⁺ DENV-específicas com função citotóxica efetora, células estas conhecidas como células T efetoras de memória RA (T_{EM}RA), bem como seu papel protetor durante infecções secundárias por DENV (Tian *et al.*, 2017; Weiskopf *et al.*, 2015b). Células TCD4⁺ citotóxicas além de expressarem grânulos para atividade lítica direta, possuem também um perfil polifuncional de ativação, expressando INF- γ , TNF- α e IL-2. Elas já foram detectadas no soro de pacientes com infecção viral crônica por citomegalovírus humano (HCMV), HIV-1 e diversos vírus de hepatites virais (Marshall & Swain, 2011). De forma semelhante, células NK expressando marcadores de citotoxicidade também foram associadas com o desenvolvimento de formas mais brandas da doença (Azeredo *et al.*, 2006).

Recentemente, também foram identificadas células T CD4⁺ do perfil Tfh (“*follicular helper*”), capazes de circular entre os centros germinativos dos linfonodos e facilitar a expansão clonal de células B, como possíveis responsáveis pelo aumento da produção e a afinidade de anticorpos DENV-específicos durante uma infecção secundária, de forma a gerar uma maior capacidade neutralizadora desses anticorpos (Saron *et al.*, 2018). Em um estudo realizado por Rivino e colaboradores com células T provenientes de pacientes adultos que sofreram infecção secundária por dengue, aproximadamente 50% das células T CD4⁺ DENV-específicas apresentaram o fenótipo Tfh (CXCR5⁺), evidenciando a importância desse subtipo celular (Rivino *et al.*, 2013). Nesse sentido, o desenvolvimento de uma vacina anti-dengue que contenha epítopos T CD4⁺ que promovam respostas Tfh torna-se importante, principalmente quando levamos em consideração que a diversidade de alelos HLA encontrados ao redor do mundo pode favorecer magnitudes de respostas de células T tanto altas quanto baixas, protetoras ou suscetíveis às formas graves de dengue.

De fato, a imunodominância de epítopos específicos de DENV foi associada a diferentes alelos de HLA (Mathew *et al.*, 1998; Weiskopf *et al.*, 2013, 2015a). Em estudos conduzidos no Sudeste Asiático, a suscetibilidade aos quadros mais graves de dengue foi associada aos alelos HLA-A*01:01, HLA-A*24:02/03/10, HLA-A*02:07, HLA-A*24,

HLA-A*31, HLA-DRB1*08 e HLA-B*53, por exemplo, enquanto que os alelos HLA-A*03, HLA-A*33, HLA-B*18, HLA-B*35:01, HLA-DRB1*09:01 foram associados com proteção (Appanna *et al.*, 2010; Loke *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2008; Malavigne *et al.*, 2011; Stephens *et al.*, 2002; Weiskopf *et al.*, 2013). Da mesma forma, certos alelos HLA-DRB1 em populações do Sri Lanka foram associados ao menor risco de hospitalização e maior magnitude de respostas de células T (Weiskopf *et al.*, 2016). No Brasil, alelos HLA-A*01 foram associados com susceptibilidade à febre do dengue hemorrágica (Monteiro *et al.*, 2012). Em um estudo recente, foi observado que certos resíduos na cadeia β da região determinadora de complementaridade (CDR2 β) do receptor TCR influenciam no reconhecimento de peptídeos específicos a um determinado sorotipo, demonstrando mais uma vez a influência da genética do hospedeiro no desenvolvimento da doença (Culshaw *et al.*, 2017).

Sendo assim, no presente estudo também investigamos os padrões imunogênicos da resposta conferida pela vacina pcTPANS1 em camundongos C57BL/6, que possuem o haplótipo MHC H-2_b, diferente do haplótipo H-2_d presente nos camundongos BALB/c. Como observamos anteriormente que os camundongos C57BL/6 não são susceptíveis à infecção com a nossa amostra de DENV2 neuroadaptada, inoculada por via intracerebral, somente avaliamos a imunogenicidade dos peptídeos contidos na proteína NS1 através de ensaios de ELISPOT. O estímulo frente à mesma biblioteca de peptídeos de NS1 revelou outros epítomos imunodominantes capazes de estimular significativamente a produção de IFN- γ nos camundongos C57BL/6 imunizados com a vacina pcTPANS1 (peptídeos N56 e N62). Entretanto, identificamos o peptídeo N17 como relevante para a produção de IFN- γ tanto em camundongos BALB/c quanto C57BL/6 após imunização com a nossa vacina, indicando a existência de epítomos conservados entre essas duas linhagens. Vale ressaltar que o peptídeo N35 também foi comum à resposta dessa citocina nas duas linhagens, embora a produção de IFN- γ só tenha sido significativamente aumentada após o desafio viral no caso de camundongos BALB/c. Isso indica que, embora haja epítomos conservados, muito da resposta imune antiviral depende do background genético do hospedeiro.

De forma paralela aos estudos de HLA, atualmente é cada vez mais teorizada a importância de uma vacina que possa induzir respostas de proteção cruzada não só entre os sorotipos de DENV, mas também em relação a outros flavivírus (Saron *et al.*, 2018; Wen & Shresta, 2019). Já foi demonstrado que células T CD4⁺ do perfil de memória efetora (T_{EM}) de camundongos JEV-imunes são capazes de adotar um perfil T_{fh} quando transferidas para camundongos desafiados com DENV1, indicando um possível papel protetor de células T

com reatividade cruzada no desenvolvimento de respostas humorais contra infecções heterólogas entre flavivírus em geral (Saron *et al.*, 2018).

Outros testes serão necessários para investigar se as respostas de célula T observadas neste projeto induzidas pela vacina pcTPANS1 pertencem a um espectro polifuncional de ativação. Futuramente pretendemos realizar ensaios de marcação simultânea de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-10, bem como avaliar marcadores de ativação citotóxica como CD107a e Granzima B e/ou Perforina e marcadores fenotípicos de rotina, CD3, CD4 e CD8.

A investigação não só da magnitude de respostas, mas também do perfil funcional das células ativadas por peptídeos específicos é essencial no desenvolvimento de vacinas contra dengue mais efetivas e seguras, tornando-se cada vez mais desejável a inclusão de epítomos de relevância protetora em vacinas anti-dengue. Neste sentido, o presente trabalho vem contribuir com a identificação de epítomos de relevância na resposta anti-NS1 de DENV2, bem como auxiliar no estudo dos mecanismos imunes induzidos pela vacina de DNA pcTPANS1.

6. Conclusões

- Neste trabalho nós identificamos sete peptídeos imunogênicos em camundongos BALB/c importantes na resposta de IFN- γ contra a proteína NS1 de DENV-2 gerada com a vacina de DNA pcTPANS1: os peptídeos N17 (NLMWKQITPELNHIL), N46 (SKLMSAAIKDNRAVH) e N67 (AGPWHLGKLEMDDFD). Após infecção viral, também identificamos os peptídeos N12 (AIQKAHEEGICGIRS), N14 (GICGIRSVTRLENLM), N35 (GPETAECPNTNRAWN) e N41 (GVFTTNIWLKLREKQ). O peptídeo N67 se mostrou como o peptídeo mais imunodominante.
- Esses peptídeos foram capazes de estimular a produção de IFN- γ tanto em células T CD4+ quanto T CD8+, mas não foram capazes de estimular um aumento significativo na porcentagem de células produtoras de TNF- α , com exceção do peptídeo N67 e N14, este último apenas após o desafio viral.
- Os peptídeos mais imunogênicos quanto à resposta de IFN- γ (N14, N17, N35 e N67) não foram capazes de induzir a ativação de respostas citotóxicas nos ensaios *in vivo* e, segundo nosso estudo comparativo com um peptídeo de 9 aminoácidos contido dentro do peptídeo N67, esta capacidade está correlacionado com o tamanho dos peptídeos.
- O estímulo com os diferentes peptídeos de NS1 não levou a um aumento nas porcentagens de células T CD4+ e CD8+ expressando a molécula CD107a, entretanto, a presença do vírus e/ou de imunização prévia com a vacina pcTPANS1 levou a uma exposição menor de moléculas CD107a na superfície dessas células, detectado através da diminuição da intensidade de fluorescência nos ensaios de citometria de fluxo.
- Peptídeos de NS1 diferentes foram capazes de induzir a produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos C57BL/6 quando comparado com camundongos BALB/c: N08, N56 e N62. Entretanto, dois peptídeos foram comuns também às respostas de IFN- γ de ambas as cepas murinas: N17 e N35, embora este último apenas após desafio viral, ressaltando a existência de epítomos conservados capazes de estimular uma ampla gama de alelos MHC/HLA.

7. Perspectivas

Como perspectivas para a conclusão desse estudo pretendemos: avaliar o estímulo dos peptídeos de NS1 identificados neste trabalho frente a células oriundas de camundongos apenas infectados com DENV2 sem imunização prévia; investigar atividade induzida por esses peptídeos em infecções por diferentes sorotipos de dengue; repetir os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, dessa vez avaliando também a expressão de granzima B e perforina e a capacidade de estímulo às células de camundongos não-vacinados e infectados com dengue ou apenas vacinados com pcTPANS1; avaliar se a vacina de pcTPANS1 induz a ativação de linfócitos T polifuncionais produtores de múltiplas citocinas; além de investigar o papel citotóxico das células NK e NK T na resposta direcionada contra a proteína NS1 em camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1.

8. Referências Bibliográficas

Akey, D.L., Brown, W.C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T.J. et al. (2014) Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* **343**: 881–5.

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* **40**: 376–81.

Angelo, M.A., Grifoni, A., O'Rourke, P.H., Sidney, J., Paul, S., Peters, B. et al. (2017). Human CD4+ T Cell Responses to an Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Parallel Those Induced by Natural Infection in Magnitude, HLA Restriction, and Antigen Specificity. *J Virol.* **91**(5): e02147-16.

Appanna, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L., Sekaran, S.D. (2010). Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS. One* **5**(9): e13029.

Arredondo-Garcia. J.L., Hadinegoro, S.R., Reynales, H., Chua, M.N., Rivera Medina, D.M., Chotpitayasunondh, T. et al. (2018). Four-year safety follow-up of the tetravalent dengue vaccine efficacy randomized controlled trials in Asia and Latin America. *Clin Microbiol Infect.* **24**: 755–63.

Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R.E., Somnuk, P., Blom, A.M., Youn, S., Diamond, M.S. et al. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* **207**(4): 793-806.

Avirutnan, P., Hauhart, R.E., Somnuk, P., Blom, A.M., Diamond, M.S., Atkinson, J.P. et al. (2011). Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.* **207**(4): 793-806.

Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S. et al. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis.* **193**(8): 1078-1088.

Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrer, W. et al. (2007). Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* **3** (11): e183.

Azeredo, E.L., De Oliveira-Pinto, L.M., Zagne, S.M., Cerqueira, D.I., Nogueira, R.M., Kubelka, C.F. (2006). NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* **143**(2): 345-56.

Azevedo, A. S., Yamamura, A. M. Y., Freire, M. S., Trindade, G. F., Bonaldo, M. et al. (2011). DNA Vaccines against Dengue Virus Type 2 Based on Truncate Envelope Protein or Its Domain III. *PLoS ONE* **6**(7): e20528.

Azevedo, A.S., Goncalves, A.J.S., Archer, M., Freire, M.S., Galler, R., Alves, A.M.B. (2013). The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One* **8**(3): e58357.

Beatty, P.R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S.S., Glasner, D.R., Hopkins, K. Harris, E. et al. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* **7**(304): 304ra141.

Bente, D.A. & Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models.* **3**(1): 97-103.

Bente, D.A., Melkus, M.W., Garcia, J.V., Rico-Hesse, R. (2005). Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J. Virol.* **79**: 13797–13799.

Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C. et al. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* **281**: 65-78.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L. et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**(7446): 504-7.

Braga, E.L.A., Moura, P., Pinto, L.M.O., Ignácio, S.R.N. et al. (2001). Detection of Circulant Tumor Necrosis Factor-, Soluble Tumor Necrosis Factor P75 and Interferon- in Brazilian Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**(2): 229–232.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Semana Epidemiológica (SE) 01 a 52 (30/12/2018 a 30/12/2019). 2020.

Buggert, M., Nguyen, S., McLane, L.M., Steblyanko, M., Anikeeva, N., Paquin-Proulx, D. et al. (2018). Limited immune surveillance in lymphoid tissue by cytolytic CD4+ T cells during health and HIV disease. *PLoS Pathog.* **14**(4): e1006973.

Bustos-Arriaga, J., García-Machorro, J., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L. et al. (2011). Activation of the innate immune response against dengue in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Negl Trop Dis.* **5**: e1420.

Campos, J.L., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G.R. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology* **19**: 1189–1198.

Carlin, A.F., Plummer, E.M., Vizcarra, E.A., Sheets, N., Joo, Y., Tang, W. et al. (2017). An IRF-3-, IRF-5-, and IRF-7-Independent Pathway of Dengue Viral Resistance Utilizes IRF-1 to Stimulate Type I and II Interferon Responses. *Cell Rep.* **21**: 1600–1612.

Chambers, T.J., Weir, R.C., Grakoui, A. et al. (1990). Evidence that the N-terminal domain of non-structural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein *Proc Natl Acad Sci. USA* **87**(22): 8898-8902.

Chen, H.R., Chuang, Y.C., Lin, Y.S., Liu, H.S., Perng, G.C., Yeh, T.M. et al. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLoS Negl Trop Dis.* **10**(7): e0004828

Chen, H.R., Lai, Y.C., Yeh, T.M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *J Biomed Sci.* **25**(1): 58.

Cheng, H.J., Lin, C.F., Lei, H.Y., Liu, H.S., Yeh, T.M., Luo, Y.H. et al. (2009). Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med.* **234**(1): 63-73.

Cheng, H.J., Lin, C.F., Lei, H.Y., Liu, H.S., Yeh, T.M., Luo, Y.H. et al. (2009). Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med.* **234**(1): 63-73.

Christian, E.A., Kahle, K.M., Mattia, K., Puffer, B.A., Pfaff, J.M., Miller, A. et al. (2013). Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**(46): 18662-7.

Clark, K., Onlamoon, N., Hsiao, H.-M., Perng, G., Villinger, F. (2013). Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Frontiers in Microbiology* 4: e305.

Coronel-Ruiz, C., Gutiérrez-Barbosa, H., Medina-Moreno, S., Velandia-Romero, M.L., Chua, J.V., Castellanos, J.E. et al. (2020). Humanized Mice in Dengue Research: A Comparison with Other Mouse Models. *Vaccines (Basel)* **8**(1): E39.

Costa, S.M., Azevedo, A.S., Paes, M.V., Sarges, F.S., Freire, M.S., Alves, A.M.B. (2007). DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* **358**: 413–23.

Costa, S.M., Paes, M.V., Barreto, D.F., Pinhão, A.T., Barth, O.M., Queiroz, J.L.S. et al. (2006). Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* **24**: 195–205.

Costa, S.M., Yorio, A.P., Gonçalves, A.J., Vidale, M.M., Costa, E.C., Mohana-Borges, R. et al. (2011). Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One* **6**(10): e25685.

Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol.* **35**: 149-176.

Culshaw, A., Ladell, K., Gras, S., McLaren, J.E. et al. (2017). Germline bias dictates cross-serotype reactivity in a common dengue-virus-specific CD8+ T cell response. *Nat Immunol.* **18**(11): 1228-1237.

Danko, J.R., Kochel, T., Teneza-Mora, N., Luke, T.C., Raviprakash, K., Sun, P. et al. (2018). Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial. *Am J Trop Med Hyg.* **98**(3): 849-856.

De Matos, A.M., Carvalho, K.I., Rosa, D.S., Villas-Boas, L.S., da Silva, W.C., Rodrigues, C.L. et al. (2015). CD8+ T Lymphocyte Expansion, Proliferation and Activation in Dengue Fever. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**: e0003520.

- De Paula, S.O., Lima, D.M., de Oliveira França, R.F., Gomes-Ruiz, A.C., da Fonseca, B.A.L. (2008). A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol.* **153**: 2215–23.
- Diaz, C., Lin, L., Martinez, L.J., Eckels, K.H., Campos, M., Jarman, R.G., et al. (2018). Phase I randomized study of a tetravalent dengue purified inactivated vaccine in healthy adults from Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg.* **98**: 1435–43.
- Diegel, M.L., Chen, F., Laus, R., Graddis, T.J., Vidovic, D. (2003). Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Presentation of Protein Antigens without Prior Intracellular Processing. *Scandinavian Journal of Immunology* **58** (1): 1-8.
- Duan, Z. L., Liu, H.F., Huang, X., Wang, S.N. et al. (2015). Identification of Conserved and HLA-A*2402-Restricted Epitopes in Dengue Virus Serotype 2. *Virus Research* **196**. Elsevier B.V.: 5–12.
- Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Limpitikul, W. et al. (2010). Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**(39): 16922–16927.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M., Lai, C.J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* **65**(5): 2467-75.
- FDA (2019). The U.S. Food and Drug Administration. FDA News Release (05/01/19). Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-dengue-disease-endemic-regions>> Acessado em 05 de janeiro de 2020.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A., Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol.* **73**(7): 6104-10.
- Flipse, J. & Smit, J. M. 2015. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(6): e0003749.
- Friberg, H., Bashyam, H., Toyosaki-Maeda, T., Potts, J.A. et al. (2011). Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep.* **1**: 51.
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem.* **266**: 21327-21330.
- Gao, G. Wang, Q., Dai, Z., Calcedo, R., et al. (2008). Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Human Gene Therapy* **19**(9): 927–36.
- Garcia M1, Wehbe M2, Lévêque N1, Bodet C2. (2017). Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur Cytokine Netw.* **28**(2): 41-51.

- Glasner, D.R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D.A., Beatty, P.R., Harris, E. et al. (2017). Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLoS Pathog.* **13**(11): e1006673.
- Gonçalves, A. J. S., Oliveira, E. R. A., Costa, S. M. & Alves, A. M. B. et al. (2015). Cooperation between CD4+ T Cells and Humoral Immunity Is Critical for Protection against Dengue Using a DNA Vaccine Based on the NS1 Antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(12): e0004277.
- Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S. et al. (1999). Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *J Infect Dis.* **179**: 755–762.
- Gromowski, G.D., Henein, S., Kannadka, C.B., Barvir, D.A., Thomas, S.J., de Silva, A.M. et al. (2018). Delineating the serotype-specific neutralizing antibody response to a live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* **36**(18): 2403-2410.
- Gubler, D.J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health.* **39**(4 Suppl): 3-11.
- Gunther, V.J., Putnak, R., Eckels, K.H., Mammen, M.P. et al. (2011). A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* **29**: 3895–3904.
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J.E., Salmon, J.E., d’Alayer, J., Ermonval, M. et al. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**(19): 8003-8.
- Guy, B. & Jackson, N. (2016). Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nat Rev Microbiol.* **14**(1): 45-54.
- Guzman, A. & Istúriz, R.E. (2010). Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents.* **36**(suppl 1): s40-42.
- Guzman, M. G. & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet* **385**(9966): 453–465.
- Gwinn, W., Sun, W., Innis, B.L., Caudill, J., King, A.D. (2003). Serotype-specific T(H)1 responses in recipients of two doses of candidate live-attenuated dengue virus vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* **69**(6 Suppl): 39-47.
- Hadinegoro, S.R., Arredondo-García, J.L., Capeding, M.R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R. et al. 2015. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med.* **373** (13):1195-206.
- Halstead, S. B., Nimmannitya, S., Cohen, S., N. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* **42**(5): 311–328.
- Halstead, S.B & O’Rourke, E.J. (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**(5596): 739-741.

- Halstead, S.B. (1980). Dengue haemorrhagic fever: a public health problem and a field for research. *Bulletin on the World Health Organization*. **58**(1):1-21.
- Halstead, S.B. (2007). Dengue. *Lancet*. **370**(9599): 1644-52.
- Halstead, S.B. (2017). Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine* **35** (47): 6355-6358.
- Halstead, S.B., Casals, J., Shotwell, H., Palumbo, N. (1973). Studies on the immunization of monkeys against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med Hyg*. **22**(3): 365-74.
- Harris, E. Holden, K.L. Edgil, D. Polacek, C., Clyde, K. (2006). Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found Symp*. **277**: 23-39.
- Hatch, S., Endy, T.P., Thomas, S., Mathew, A. et al. (2011). Intracellular Cytokine Production by Dengue Virus-specific T cells Correlates with Subclinical Secondary Infection. *J Infect Dis*. **203**: 1282–129.
- Heinz, F.X. & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology* **55**(4): 289–295. 2012.
- Henriques, H.R., Rampazo, E.V., Gonçalves, A.J., Vicentin, E.C., Amorim, J.H., Panatieri, R.H. et al. (2013). Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. **7**(7): e2330.
- Hodge, K., Kamkaew, M., Pisitkun, T., Chinnaronk, S. (2019). Flavors of Flaviviral RNA Structure: towards an Integrated View of RNA Function from Translation through Encapsidation. *Bioessays*. **41**(8): e1900003.
- Huang, C.Y., Kinney, R.M., Livengood, J.A., Bolling, B., Arguello, J.J., Luy, B.E. et al. (2013). Genetic and phenotypic characterization of manufacturing seeds for a tetravalent dengue vaccine (DENVax). *PLoS Negl Trop Dis*. **7**(5): e2243.
- Huang, K.J., Li, S.Y.J., Chen, S.C., Liu, H.S., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, C.C., Lei, H.Y. et al. (2000). Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-Virus-Infected mice. *J Gen Virol*. **81**: 2177–2182.
- Issur, M., Geiss, B.J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J. et al. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*. **15**(12): 2340-50.
- Jain, A. & Chaturvedi, U.C. (2010). Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **59**(2):119-30.
- Jego, G. Palucka, A. K. Blanck, J.-P. Chalouni, C. et al. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**: 225-234.
- Jhan, M.K., Huang Fu, W.C., Chen, Y.F., Kao, J.C., Tsai, T.T., Ho, M.R. et al. (2018). Anti-TNF- α restricts dengue virus-Induced neuropathy. *J Leukoc Biol*. **104**: 961–968.

- Johnson, A.J. & Roehrig, J.T. (1999). New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol.* **73**: 783–786.
- Khan, K.H. (2013). DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* **3**(1): 26–35.
- Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G. et al. (2004). Analysis of Antigen-Specific T-Cell Responses with Synthetic Peptides — What Kind of Peptide for Which Purpose? *Human Immunology* **65**(5): 523-53.
- Kirkpatrick, B.D., Durbin, A.P., Pierce, K.K., Carmolli, M.P., Tibery, C.M., Grier, P.L., et al. (2015). Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to healthy, flavivirus-naive adults. *J Infect Dis.* **212**(5): 702–10.
- Kochel, T., Wu, S.J., Raviprakash, K., Hobart, P., Hoffman, S., Porter, K. et al. (1997). Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **15**(5): 547-52.
- Koide, Y., Nagata, T., Yoshida, A., Uchijima, M. (2000). DNA vaccines. *Jpn J Pharmacol.* **83**(3): 167-74.
- Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., Mason, P.W. (2000). A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* **18**: 1133-9.
- Krishnakumar, V., Durairajan, S.S.K., Alagarasu, K., Li, M., Dash, A.P. (2019). Recent Updates on Mouse Models for Human Immunodeficiency, Influenza, and Dengue Viral Infections. *Viruses* **11**(3): E252
- Kurane, I. & Ennis, F.E. (1992). Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* **4**(2): 121-7.
- Kurane, I., Hebblewaite, D., Brandt, W.E., Ennis, F.A. (1984). Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* **52**(1): 223-30.
- Kuruvilla, J.G., Troyer, R.M., Devi, S., Akkina, R. (2007). Dengue virus infection and immune response in humanized RAG^{-/-}c^{-/-} (RAG-hu) mice. *Virology* **369**: 143-152.
- Lai, Y.C., Chuang, Y.C., Liu, C.C., Ho, T.S., Lin, Y.S., Anderson, R. et al. (2017). Antibodies against modified NS1 wing domain peptide protect against dengue virus infection. *Sci Rep.* **7**(1): 6975.
- Lambrechts, L. Scott, T.W. & Gubler, D.J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**(5): e646.
- Le Bon, A., Schiavone, G., D'Agostino, G., Greaser, F. et al. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**: 461-470.

- Libraty, D.H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., Endy, T.P., Ennis, F.A. (2001). Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis. *J Virol.* **75**: 3501–3508.
- Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D. et al. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* **186**(8): 1165-1168.
- Lin, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., et al. (2002). Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* **169**: 657-64.
- Lin, S.W., Chuang, Y.C., Lin, Y.S., Lei, H.Y., Liu, H.S., Yeh, T.M. et al. (2012). Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J Infect.* **64**(3): 325-34.
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* **73**(6): 4611-4621.
- Liu, J., Chiu, C., Chen, Y., Wu, H. (2011). Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. *The Journal of Biological Chemistry* **286** (11): 9726-36.
- Liu, Y., Liu, J., & Cheng, G. (2016). Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerging Microbes & Infections* **5**(7): e77–. 2016.
- Loke, H., Bethell, D.B., Phuong, C.X., Dung, M. et al. (2001). Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* **184**(11): 1369-1373.
- Malavige, G.N., Rostron, T., Rohanachandra, L.T., Jayaratne, S.D. et al. (2011). HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lanka population. *PLoS One* **6**(6): e20581.
- Mangada, M.M. & Rothman, A. L. (2005). Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4⁺ T Cells to Heterologous Serotypes. *J Immunol.* **175**(4): 2676–2683.
- Mangada, M.M., Endy, T.P., Nisalak, A., Chunsuttiwatt, S. et al. (2002). Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *The Journal of Infectious Diseases* **185**(12): 1697–1703.
- Manoff, S.B., George, S.L., Bett, A.J., Yelmene, M.L., Dhanasekaran, G., Eggemeyer, L. et al. (2015). Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine. *Vaccine* **33**: 7126–34.

- Marques, R.E., Guabiraba, R., Del Sarto, J.L., Rocha, R.F., Queiroz, A.L., Cisalpino, D. et al. (2015). Dengue virus requires the CC-Chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. *Immunology* **145**: 583–596.
- Marshall, N.B. & Swain, S.L. (2011). Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol.* **2011**: 954602.
- Mathew, A., Kurane, I., Green, S., Stephens, H.A.F. et al. (1998). Predominance of HLA-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to Serotype-Cross-Reactive Epitopes on Nonstructural Proteins following Natural Secondary Dengue Virus Infection. *J Virol.* **72**(5): 3999–4004.
- McBurney, S.P., Sunshine, J.E., Gabriel, S., Huynh, J.P., Sutton, W.F., Fuller, D.H. et al. (2016). Evaluation of protection induced by a dengue virus serotype 2 envelope domain III protein scaffold/DNA vaccine in non-human primates. *Vaccine* **34** (30): 3500-7.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., Swain, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* **130**(1): 1-9.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* **282**(12): 8873-82.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D.A., Panetta, A.K., Sester, D.P., Liu, L. et al. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med.* **7**(304): 304ra142.
- Moi, M. L., Takasaki, T., & Kurane, I. (2016). Human antibody response to dengue virus: implications for dengue vaccine design. *Tropical Medicine and Health* **44**(1):1–6.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X.N., Vasanawathana, S. et al. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine* **9**(7): 921–927.
- Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S. et al. (2006). T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* **176**(6): 3821–3829.
- Mota, J. & Rico-Hesse, R. (2011). Dengue Virus Tropism in Humanized Mice Recapitulates Human Dengue Fever. *PLoS ONE* **6**: e20762.
- Murphy, B.R. & Whitehead, S.S. (2011). Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol.* **29**: 587-619.
- Nagesh, K., Tripathi, A., Paban K., Asha, M. et al. (2011). Detection of Dengue Virus. *Methods in Molecular Biology* **665**: 51-64.
- Nascimento, E.J.M., Mailliard, R.B., Khan, A.M., Sidney, J. et al. (2013). Identification of Conserved and HLA Promiscuous DENV3 T-Cell Epitopes. *PLoS Negl Trop Dis.* **7**(10): e2497.

- Nasirudeen AM1, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* **5**(1): e926.
- Ngono, A.E., Chen, H.W., Tang, W.W, Joo, Y. et al. (2016). Protective Role of Cross-Reactive CD8 T Cells Against Dengue Virus Infection. *E Biomedicine* **13**: 284–293.
- Nguyen, T.P., Kikuchi, M., Vu, T.Q., Do, Q.H. et al. (2008). Protective and Enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24 for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* **2**(10): e304.
- Nogueira, R.M. & Eppinghaus, A.L. (2011). Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **106**(3): 255-6.
- Oliveira, E. R. A., Gonçalves, A. J. S., Costa, S. M., Alves, A. M. B. et al.(2016a). Aspects of T Cell-Mediated Immunity Induced in Mice by a DNA Vaccine Based on the Dengue-NS1 Antigen after Challenge by the Intracerebral Route. *PLoS ONE* **11**(9): e0163240.
- Oliveira, E.R., Amorim, J.F., Paes, M.V., Azevedo, A.S. et al. (2016b). Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. *Virology* **489**: 95-107.
- Osorio, J.E., Wallace, D., Stinchcomb, D.T. (2016). A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. *Expert Rev Vaccines* **15**(4): 497-508.
- Paes, M.V., Pinhão, A.T., Barreto, D.F., Costa, S.M., Oliveira, M.P., Nogueira, A.C. et al. (2005). Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* **338**: 236–246.
- Paul, D. & Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol.***2**(2): 32-48.
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M. et al. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* **173**: 1099-1109.
- Pinheiro, F.P & Corber, S.J. (1997). Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.* **50**(3-4): 161-9.
- Pinto, P.B.A., Assis, M.L., Vallochi, A.L., Pacheco, A.R. et al. (2019). T Cell Responses Induced by DNA Vaccines Based on the DENV2 E and NS1 Proteins in Mice: Importance in Protection and Immunodominant Epitope Identification. *Front Immunol.* **10**: 1522.
- Poggianella, M., Slon Campos, J.L., Chan, K.R., Tan, H.C., Bestagno, M., Ooi, E.E. et al. (2015). Dengue E protein domain III-based DNA immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**: e0003947.
- Porter, K. R. & Raviprakash, K. (2015) Nucleic acid (DNA) immunization as a platform for dengue vaccine development. *Vaccine* **33**(50):7135–40.

- Promptchara, E., Ketloy, C., Thomas, S.J., Ruxrungtham, K. (2019). Dengue vaccine: Global development update. *Asian Pac J Allergy Immunol.* **2019**.
- Puerta-Guardo H., Glasner, D.R., Espinosa, D.A., Biering, S.B., Patana, M., Ratnasiri, K. et al. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* **26**(6): 1598-1613.e8.
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D.R., Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* **12**(7): e1005738.
- Pulendran, B. (2009). Learning immunology from the yellow fever vaccine: Innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol.* **9**: 741-747.
- Raviprakash, K., Apt, D., Brinkman, A., Skinner, C., Yang, S., Dawes, G. et al. (2006). A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. *Virology* **353**(1): 166-73.
- Raviprakash, K., Ewing, D., Simmons, M., Porter, K.R., Jones, T.R., Hayes, C.G. et al. (2003). Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology* **315**(2): 345-52.
- Raviprakash, K., Marques, E., Ewing, D., Lu, Y., Phillips, I., Porter, K.R. et al. (2001). Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* **290**(1): 74-82.
- Raviprakash, K., Porter, K.R., Kochel, T.J., Ewing, D., Simmons, M., Phillips, I. et al. (2000). Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *J Gen Virol.* **81**: 1659-67.
- Reuter, M.A., Del Rio Estrada, P.M., Buggert, M., Petrovas, C., Ferrando-Martinez, S., Nguyen, S. et al. (2017). HIV-specific CD8+T cells exhibit reduced and differentially regulated cytolytic activity in lymphoid tissue. *Cell Rep.* **21**(12): 3458-3470.
- Rivino, L. & Lim, M. Q. (2016). CD4+ and CD8+ T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. *Immunology* **150**(2):146–154.
- Rivino, L., Kumaran, E.A.P., Jovanovic, V., Nadua, K. et al. (2013). Differential Targeting of Viral Components by CD4+ versus CD8+ T Lymphocytes in Dengue Virus Infection. *J Virol.* **87**(5): 2693–2706.
- Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., Smit, J.M. et al. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Science.* **67**(16): 2773-86.
- Saade, F. & Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Exp Rev Vaccines.* **11**(2): 189–209. 2012.
- Sabchareon A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S. et al. (2012). Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* **380**(9853): 1559-67.

Sabin, A. B. (1952). Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* **1**(1): 30-50.

Sáez-Llorens, X, Tricou, V., Yu, D., Rivera, L., Jimeno, J., Villarreal, A.C. et al. (2018). Immunogenicity and safety of one versus two doses of tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2-17 years in Asia and Latin America: 18-month interim data from a phase 2, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Infect Dis.* **18**(2): 162-170.

Sarathy, V.V., White, M., Li, L., Gorder, S.R., Pyles, R.B., Campbell, G.A. et al. (2015). Lethal Murine Infection Model for Dengue Virus 3 in AG129 Mice Deficient in Type I and II Interferon Receptors Leads to Systemic Disease. *J Virol.* **89**: 1254–1266.

Sariol, C.A., Martínez, M.I., Rivera, F., Rodríguez, I.V., Pantoja, P., Abel, K., et al. (2011). Decreased dengue replication and an increased anti-Viral humoral response with the use of combined toll-Like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. *PLoS ONE* **6**: e19323.

Saron, W.A.A., Rathore, A.P.S., Ting, L., Ooi, E.E. et al. (2018). Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells. *Sci Adv.* **4**(7): eaar4297.

Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens* **11**(11): e1005277.

Schlesinger, J.J, Brandriss, M.W. & Walsh, E.E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* **68**(Pt 3): 853-7.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W. & Walsh, E.E. (1985). Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *J Immunol.* **135**(4): 2805-9.

Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., et al. (2014). Pan-Viral specificity of IFN-Induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **505**: 691–695.

Simon-Lorière, E., Duong, V., Tawfik, A., Ung, S. et al. (2017). Increased adaptive immune responses and proper feedback regulation protect against clinical dengue. *Sci Transl Med.* **9**(405): eaal5088.

Singla, M., Kar, M., Sethi, T., Kabra, S.K. et al. (2016). Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India-Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis.* **10**(4): e0004642.

Soares, C.N., Cabral-Castro, M.J., Peralta, J.M., de Freitas, M.R., Zalis, M. et al. (2011). Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci.* **303**: 75–9.

Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M. et al. (2018). Effect of dengue aerostats on dengue vaccine safety and efficacy. *N Engl J Med* **379**: 327-340.

- Srikiatkachorn, A. Mathew, A. & Rothman, A. (2017). Immune Mediated Cytokine Storm and Its Role in Severe Dengue. *Seminars in Immunopathology* **39**(5): 563–574.
- St. John, A.L & Rathore, A.P.S. (2019). Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nat Rev Immunol.* **19**(4): 218-230.
- Stephens, H.A., Klaythong, R., Sirikong, M., Vaughn, D.W. et al. (2002). HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* **60**(4): 309-318.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**: 751-761.
- Surasombatpattana, P., Hamel, R., Patramool, S., Luplertlop, N., Thomas, F., Desprès, P. et al. (2011). Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infect Genet Evol.* **11**: 1664–1673.
- Swaminathan, S. & Khanna, N. (2019). Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. *Int J Infect Dis.* **84**: S80-S86.
- Tan, G.K.X., Ng, J.K.W., Lim, A.H.Y., Yeo, K.P., Angeli, V., Alonso, S. et al. (2011). Subcutaneous infection with non-Mouse adapted dengue virus D2Y98P strain induces systemic vascular leakage in AG129 mice. *Ann Acad Med Singap* **40**: 523–532.
- Tang, D.C., DeVit, M. & Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*.**356**: 152–154.
- Teixeira, M.G., Siqueira, J.B. Jr., Ferreira, G.L., Bricks, L., Joint, G. (2013). Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* **7**(12): e2520.
- Tian, Y., Babor, M., Lane, J., Schulten, V. et al. (2017). Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun.* **8**(1): 1473.
- Tian, Y., Sette, A. & Weiskopf, D. (2016). Cytotoxic CD4 T Cells: Differentiation, Function, and Application to Dengue Virus Infection. *Front Immunol.* **7**(531): 1–9.
- Tian, Y.S., Zhou, Y., Takagi, T., Kameoka, M., Kawashita, N. (2018). Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **66** (3):191-206.
- Tricou, V., Minh, N.N., Farrar, J., Tran, H.T., Simmons, C.P. (2011). Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis.* **5**(9): e1309.
- Tripathi, N.K. & Shrivastava, A. (2018). Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. *Front Immunol.* **9**: 1919.
- Troupin, A., Shirley, D., Londono-Renteria, B., Watson, A.M., McHale, C., Hall, A. et al. (2016). A Role for Human Skin Mast Cells in Dengue Virus Infection and Systemic Spread. *J. Immunol.* **197**: 4382–4391.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J. et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**(5102): 1745–1749.

Umareddy I., Pluquet O., Wang Q.Y., Subhash G Vasudevan S.G., Chevet E., Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal* **4**:91

Van den Broek, M.F., Müller, U., Huang, S., Aguet, M., Zinkernagel, R.M. et al. (1995). Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J Virol.* **69**: 4792–4796.

Vannice, K.S. Durbin, A. & Hombach, J. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine* **34**(26): 2934–2938. 2016.

Vaughn, D.W., Hoke, C.H. Jr., Yoksan, S., LaChance, R., Innis, B.L., Rice, R.M. et al. (1996). Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine* **14**(4): 329-36.

Villar, L., Dayan, G.H., Arredondo-García, J.L., Rivera, D.M., et al. (2015). CYD15 Study Group, Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* **372**: 113-123.

Wakil, A.E., Wang, Z.E., Ryan, J.C., Fowell, D.J., Locksley, R.M. (1998). Interferon gamma derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper type 1 development. *J Exp Med* **188**(9): 1651-1656.

Wan, S.W., Lu, Y.T., Huang, C.H., Lin, C.F., Anderson, R., Liu, H.S. et al. (2014). Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One* **9**(3): e92495.

Watterson, D., Modhiran, N., Young, P.R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* **130**: 7-18.

Weiskopf, D., Alwis, R., Paul, S., Angelo, M.A. et al. (2014). Identification of CD8+ T Cell Epitopes in DENV Using Samples from a Nicaragua Cohort. IEDB ID: 1027503.

Weiskopf, D., Angelo, M. A., Bangs, D. J., Sidney, J. et al. (2015a). The human CD8+ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *J Virology* **89** (1): 120–128.

Weiskopf, D., Angelo, M.A., Azeredo, E.L., Sidney, J. et al. (2013). Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(22): e2046–e2053.

Weiskopf, D., Angelo, M.A., Grifoni, A., O'Rourke, P.H. et al. (2016). HLA-DRB1 alleles are associated with different magnitudes of dengue virus-specific CD4+ T-Cell Responses. *Journal of Infectious Diseases* **214**(7): 117-1124.

Weiskopf, D., Cerpas, C., Angelo, M.A., Bangs, D.J. et al. (2015b). Human CD8+ T-Cell Responses Against the 4 Dengue Virus Serotypes Are Associated with Distinct Patterns of Protein Targets. *Journal of Infectious Diseases* **212**: 1743–1751.

Weiskopf, D., Bangs, D.J., Sidney, J. Kolla, R.V. *et al.* (2015c). Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **112**: e4256–e4263.

Wen, J. & Shrestha, S. (2019). Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine? *Curr Opin Immunol*. **59**:1-8.

Whitehead, S.S. (2016). Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYDTM vaccine? *Expert Rev Vaccines* **15**: 509–17.

WHO. (2007). World Health Organization. Vaccine introduction guidelines. Geneva, World Health Organization.

WHO. (2009). World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, new edition. Geneva, World Health Organization.

WHO. (2014). World Health Organization. Dengue Bulletin 2013 vol 37. Regional Office for South-East Asia, World Health Organization.

WHO. (2018). World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper – September 2018 *Weekly Epidemiological Record* **36**(93): 457–476.

Winkler, G. Maxwell, S.E., Ruelmler, C., Stollar, V. (1989). Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* **171**(1): 302-305.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. *et al.* (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**: 1465–1468.

Wu, S.F., Liao, C.L., Lin, Y.L., Yeh, C.T., Chen, L.K., Huang, Y.F. *et al.* (2003). Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* **21**(25-26): 3919-29.

Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., Shi, P.Y. (2015). Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J Virol* **89**(2): 1298-313.

Xu, H., Di, B., Pan, Y.X. *et al.* (2006). Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. **44**(8): 2872-2878.

Yachi, P.P., Ampudia, J., Zal, T., Gascoigne, N.R. *et al.* (2006). Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction — a role for CD8 in distinguishing antigen quality. *Immunity* **25**(2): 203-211.

Yacoub, S., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. (2016). Recent advances in understanding dengue. *F1000 Research* **5**(F1000 Faculty Rev): 78.

Yam-Puc, J. C., Cedillo-Barrón, L., Aguilar-Medina, E. M., Ramos-Payán, R., Escobar-Gutiérrez, A., & Flores-Romo, L. (2016). The Cellular Bases of Antibody Responses during Dengue Virus Infection. *Front Immunol.* **7**(218): 1–12.

Yauch, L.E., Tyler, R.P., May, M.M., Morar, M.M. et al. (2010). CD4⁺ T cells Are Not Required for the Induction of Dengue Virus-Specific CD8⁺ T cell or Antibody Response but Contribute to Protection after Vaccination. *J Immunol.* **185**(9): 5405-5416.

Yauch, L.E., Zellweger, R.M., Kotturi, M.F., Qutubuddin, A. et al. (2009). A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8⁺ T Cells. *J Immunol.* **182**: 4865–4873.

You, L., Mao, L., Wei, J., Jin, S. et al. (2017). The crosstalk between autophagic and endo-/exosomal pathways in antigen processing for MHC presentation in anticancer T cell immune responses. *Journal of Hematology & Oncology* **10**(1): 165.

Youn, S., Li, T. McCune, B.T., Edeling, M.A., Fremont, D.H., Cristea, I.M., Diamond, M.S. (2012). Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J Virol.* **86**(13): 7360-71.

Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C., Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* **38**(3): 1053-1057.

Zellweger, R.M. & Shresta, S. (2014). Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Front Immunol.* **5**: 151.

Zellweger, R.M., Tang, W.W., Eddy, W.E., King, K., Sanchez, M.C., Shresta, S. CD8⁺ T cells can mediate short-term protection against heterotypic dengue reinfection in mice. *J Virol.* **89**: 6494-6505.,

Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D. et al. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* **22**(11): 2604-13.

Zheng, Q., Fan, D., Gao, N., Chen, H., Wang, J., Ming, Y. et al. (2011). Evaluation of a DNA vaccine candidate expressing prM-E-NS1 antigens of dengue virus serotype 1 with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in immunogenicity and protection. *Vaccine* **29**(4): 763-71.

9. Anexo I



T Cell Responses Induced by DNA Vaccines Based on the DENV2 E and NS1 Proteins in Mice: Importance in Protection and Immunodominant Epitope Identification

OPEN ACCESS

Edited by:

Gathsaurie Neelika Malavige,
University of Sri Jayawardenepura,
Sri Lanka

Reviewed by:

Bruno Mendes Roatt,
Universidade Federal de Ouro
Preto, Brazil
Alba Grifoni,
La Jolla Institute for Immunology (LJI),
United States

Arash Memarnejadian,
Sernova Corp., Canada

*Correspondence:

Ada M. B. Alves
ada@ioc.fiocruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 February 2019

Accepted: 18 June 2019

Published: 03 July 2019

Citation:

Pinto PBA, Assis ML, Vallochi AL,
Pacheco AR, Lima LM,
Quaresma KRL, Pereira BAS,
Costa SM and Alves AMB (2019)
T Cell Responses Induced by DNA
Vaccines Based on the DENV2 E and
NS1 Proteins in Mice: Importance in
Protection and Immunodominant
Epitope Identification.
Front. Immunol. 10:1522.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01522

Paolla B. A. Pinto^{1†}, Maysa L. Assis^{1†}, Adriana L. Vallochi², Agatha R. Pacheco¹,
Lauro M. Lima¹, Kátia R. L. Quaresma¹, Bernardo A. S. Pereira¹, Simone M. Costa¹ and
Ada M. B. Alves^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Viral Infections, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz),
Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratory of Immunopharmacology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz),
Rio de Janeiro, Brazil

The importance of the cellular immune response against DENV has been increasingly highlighted in the past few years, in particular for vaccine development. We have previously constructed two plasmids, pE1D2, and pcTPANS1, encoding the envelope (E) ectodomain (domains I, II, and III) and the non-structural 1 (NS1) protein of dengue virus serotype 2 (DENV2), respectively. In the present work, we analyzed the induction of the cellular response in mice immunized with these DNA vaccines and identified the immunogenic peptides. Vaccinated BALB/c mice became protected against a lethal challenge of DENV2. Depletion of CD4⁺ cells in vaccinated animals almost completely abolished protection elicited by both vaccines. In contrast, a significant number of pE1D2- and pcTPANS1-immunized mice survived virus challenge after depletion of CD8⁺ cells, although some animals presented morbidity. To identify immunogenic peptides recognized by T cells, we stimulated splenocytes with overlapping peptide libraries covering the E and NS1 proteins and evaluated the production of IFN- γ by ELISPOT. We detected two and three immunodominant epitopes in the E and NS1 proteins, respectively, and four additional NS1-derived peptides after virus challenge. Characterization by intracellular cytokine staining (ICS) revealed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were involved in IFN- γ and TNF- α production. The IFN- γ ICS confirmed reaction of almost all E-derived peptides before challenge and identified other epitopes after infection. All NS1-derived peptides were able to elicit IFN- γ production in CD4⁺ cells, while only a few peptides induced expression of this cytokine in CD8⁺ T lymphocytes. Interestingly, we observed an increase in the frequency of either CD4⁺ or CD8⁺ T cells producing TNF- α after immunization with the pE1D2 and challenge with DENV2, while lymphocytes from pcTPANS1-vaccinated animals maintained ordinary TNF- α production after virus infection. We also assessed the recognition of E and NS1 immunogenic peptides in C57BL/6 mice due to the difference in MHC haplotype

expression. Two NS1-derived epitopes featured prominently in the IFN- γ response with cells from both animal strains. Overall, our results emphasize the importance of the T cell response involved in protection against dengue induced by E and NS1 based DNA vaccines.

Keywords: dengue, DNA vaccines, T cell response, NS1, envelope protein, mice

INTRODUCTION

Dengue is one of the most important mosquito-borne viral diseases, with an overall estimation of 390 million people infected worldwide per year (1). This disease can manifest as a broad range of symptoms varying from the self-limiting dengue fever to potentially lethal severe forms, the dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome (2, 3).

Currently, different vaccines against dengue virus (DENV) are undergoing clinical trials and one is commercially available (4–6). This tetravalent vaccine, developed by Sanofi-Pasteur, is based on the backbone of the yellow fever 17D vaccine with the replacement of membrane and envelope proteins of each dengue serotype (7). Results from phase III clinical trials revealed that although individuals, especially children, presented high levels of neutralizing antibodies toward DENV2 after vaccination, they were not protected against this virus (8–10). Furthermore, recent reports showed that children who were dengue naïve at vaccination time were more susceptible to develop severe dengue after virus exposure (11–13). Such results point out that the induction of neutralizing antibodies is not the only arm of the immune response involved in protection against DENV. In fact, the importance of the cellular immune response against DENV has been increasingly highlighted in the past few years, concerning both protection and/or disease enhancement (14–20).

Most vaccine strategies against dengue are based on the envelope (E) glycoprotein. The E protein is organized in 90 homodimers in the virus surface and is reassembled into trimers at the fusion state. Each monomer is composed of domains I, II, and III, a membrane-proximal stem and a transmembrane anchor (21). Since the E protein is the major component of the virion surface and interacts with receptors present on host cells mediating virus internalization, this protein is the primary target for induction of neutralizing antibodies (22–24). However, after virus infection a T cell response that may be involved in protection is also elicited toward this protein (25–30).

Another highly immunogenic dengue protein is the non-structural 1 (NS1) glycoprotein, which is also considered an antigen for vaccine development (31–34). The NS1 is found in infected mammalian cells associated with plasma membrane as well as secreted into the circulation as soluble multimers (35–37). The secreted form seems to be implicated in immune evasion strategies (38). Moreover, convalescent dengue patients present high levels of antibodies against NS1. Recent studies also showed that this protein can induce T cell responses either in experimental animals or in humans (27, 29, 30, 39).

Based on this evidence, in the present work, we analyzed the induction of the cellular immune response in mice immunized with two previously constructed DNA vaccines (pE1D2 and pCTPANS1) against DENV2. The plasmid pE1D2 encodes the ectodomain of the E protein (domains I, II and III) (40, 41), and the plasmid pCTPANS1 contains the *ns1* gene (33, 42). BALB/c mice immunized with these DNA vaccines became protected against a lethal challenge of DENV2 and we evaluated the role of T cells in protection. Depletion of CD4⁺ T cells in vaccinated animals completely abolished protection elicited by both vaccines, while a significant number of pE1D2- and pCTPANS1-immunized mice survived virus challenge after depletion of CD8⁺ T cells. However, near half of the vaccinated animals depleted from CD8⁺ T cells presented clinical signs of infection.

We then identified the immunogenic peptides recognized by T cells from vaccinated animals, before and after virus challenge. We evaluated IFN- γ production by stimulating splenocytes with overlapping peptide libraries covering the E and NS1 proteins in enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays. Intracellular cytokine staining (ICS) assays revealed the involvement of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in IFN- γ production by splenocytes reacting mainly to the selected E-derived peptides, before and after virus challenge. In contrast, almost all the selected NS1-derived peptides were recognized by CD4⁺ T lymphocytes, while CD8⁺ cells reacted only to half of these peptides. TNF- α production was also evaluated by ICS assays, revealing expression of this cytokine by CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon stimulation with almost all E-derived peptides, especially after virus challenge. On the other hand, only two NS1-derived peptides were able to significantly induce TNF- α production. To assess the recognition of immunogenic E- and NS1-derived peptides in a different MHC haplotype, we investigated IFN- γ production in C57BL/6 mouse cells by ELISPOT. Distinct epitopes were recognized by C57BL/6 splenocytes using the same peptide libraries, although two NS1-derived epitopes were positive in the assays performed with cells from both BALB/c and C57BL/6 animals. Overall, our results emphasize the importance of the T cell response involved in dengue protection and may contribute for the development of more effective vaccines against dengue, in particular for DNA vaccines based on the E and NS1 proteins.

MATERIALS AND METHODS

Virus and DNA Vaccines

The dengue 2 virus (DENV2), strain New Guinea C (NGC, GenBank M29095), was used for cloning the NS1 and E

sequences as well as for mice challenge assays. The DNA vaccines pcTPANS1, pE1D2, and pcTPA were previously described (33, 40). Briefly, the pE1D2 plasmid encodes the ectodomain (domains I, II, and III) of the E protein while pcTPANS1 encodes the full-length *ns1* gene. In both constructions, genes were fused to the sequence encoding the human tissue plasminogen activator (t-PA) signal peptide, under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter region. The negative control, pcTPA, was derived from the commercial vector pcDNA3 (Invitrogen) and contains only the t-PA signal peptide sequence.

For DNA vaccine preparations, *Escherichia coli* DH5- α strain was transformed with the different plasmids, which were then extracted by alkaline lysis and purified by Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. Plasmids were suspended in sterile water and stored at -20°C until use. The DNAs were quantified by measuring absorbance at 260 nm in spectrophotometer (Bio Photometer, Eppendorf). Concentration and integrity of all plasmids were confirmed by 1% agarose gel electrophoresis, stained with Nancy-520 and visualized in ultraviolet transilluminator.

Animal Immunization

Four-week-old BALB/c or C57BL/6 mice, specific pathogen free (SPF), were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations (CEMIB, UNICAMP-SP, Brazil). Animals were inoculated by the intramuscular route (i.m.) with 50 μg of DNA vaccines diluted in 50 μL of phosphate buffer saline (PBS) in each tibialis posterior muscles (100 $\mu\text{g}/\text{mice}$), using 30-gauge needles. Each animal group received two doses of pE1D2 or pcTPANS1, administered 2 weeks apart, and mice were euthanized or challenged 4 weeks after the first dose. Negative control groups included naïve or pcTPA-inoculated mice. For euthanasia, animals were overexposed with a mixture of ketamine-xylazine (43) and bled by cardiac puncture.

Virus Challenge

BALB/c mice were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine and inoculated by the intracerebral (i.c.) route with 30 μL of a neuroadapted NGC DENV2 diluted in E199 medium, corresponding to 40 LD₅₀. Animals were euthanized either 7 or 21 days after infection (dpi) as described on figures legends. To ascertain vaccine protection, mice were followed up to 21 dpi, and morbidity was recorded. Clinical signs of infection were noted according to an arbitrary scale ranging from 0 to 4: 0 = no clinical signs; 1 = paralysis in one leg or alteration of the spinal column; 2 = severe paralysis in one leg and alterations of the spinal column or severe paralysis on both hind legs; 3 = severe paralysis in the hind legs and alteration of the spinal column; 4 = death. Moribund animals were submitted to euthanasia.

In vivo Depletion of CD4⁺ and CD8⁺ Cells

BALB/c mice ($n = 8-10$) immunized with pE1D2 or pcTPANS1 were depleted from CD4⁺ or CD8⁺ cells upon inoculation of

in-house produced ascitic fluids containing anti-CD4 (clone GK 1.5) or anti-CD8 antibodies (clone 56-3.7) (39). Animals were inoculated by the intraperitoneal route (i.p.) with 20 μL of ascitic fluids on days 4 and 2 before DENV2 challenge. T cell depletion was monitored by flow cytometry in blood cells stained with anti-CD3 FITC (clone 145-2C11), anti-CD8 PerCP (clone 33-6.7) and anti-CD4 PE (clone RM4-5) antibodies (BD Biosciences), and evaluated on FlowJo software.

E and NS1 Peptide Libraries

The T cell epitope mapping and characterization were performed using overlapping peptide libraries spanning the E and NS1 protein sequences of DENV2 NGC strain, consisting of 15-mer peptides overlapping each other by 11 amino acid residues. Lyophilized synthetic peptides (Mimotopes Pty Ltd) were suspended in ultrapure water at a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, with an average purity of $\sim 80\%$. After the suspension, peptides were stored at -20°C until use. Initial studies were carried out with peptides grouped in pools of 8-10 peptides according to each protein (E protein: 98 peptides, 10 pools; NS1 protein: 86 peptides, 9 pools).

Cell Isolation

Spleens and peripheral blood were harvested from previously pE1D2-, pcTPANS1- or pcTPA-inoculated animals, challenged or not with DENV2, as well as from naïve mice. For ELISPOT and ICS assays, splenocytes were isolated, and erythrocytes were lysed with BD Pharm Lyse™ (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. After red cell lysis, splenocytes were washed with PBS and suspended in RPMI-1640 medium (Sigma), in 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Blood samples from T cell-depleted mice, collected at the same day of virus challenge in the other animal groups, were treated with FACS Lysing Solution (BD Biosciences) for erythrocytes lysis and cell fixation, prior to staining and flow cytometry analysis.

Interferon Gamma ELISPOT Assays

The assays were performed using the IFN- γ ELISPOT mouse set (BD Biosciences) upon splenocyte stimulation with E and NS1 peptide libraries, according to the manufacturer's instruction. The assays were initially performed using pooled peptides. Afterwards, positive pools were selected for screening of individual peptides. Briefly, 96-well ELISPOT plates were coated overnight at 4°C with anti-IFN- γ capture monoclonal antibody (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). On the next day, plates were blocked and 5×10^5 splenocytes ($n = 3$, pooled cells) from naïve, pE1D2- or pcTPANS1-vaccinated or pcTPA-inoculated mice, challenged or not with DENV2, were incubated in triplicate with 2 μg of E or NS1 peptides (pooled or individually). Non-stimulated and concanavalin A (Con A, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulated cells were used as negative and non-specific positive controls, respectively. After an 18-h stimulation period at 37°C in 5% CO₂, cells were discarded, and plates were incubated for 2 h at 37°C with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IFN- γ biotinylated detection antibody. Plates were then incubated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate for 1 h at room temperature (diluted 1:100). Finally, plates were washed

and the spots were revealed by adding the AEC substrate set (BD Biosciences) at room temperature. The reaction was stopped by washing plates with distilled water. Spots were counted in the automated immunospot reader (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd) at the ELISPOT Multi-User Platform (Ficruz). Positivity was established by using a low stringent approach, in which ≥ 5 spot-forming cells (SFC) per 5×10^5 cells were considered positive after subtraction of the number of spots detected in the respective non-stimulated cells, and as long as above the number observed in controls (detected in cells from pcTPA-inoculated or naïve mice).

Intracellular Cytokine Staining (ICS) Assays

Splenocytes isolated from immunized or naïve BALB/c mice ($n = 5$), infected or not with DENV2, were tested by IFN- γ and TNF- α ICS assays, using the peptides previously identified as positive by the ELISPOT analysis. A total of 2×10^6 cells/well were plated in 96-well U-bottom plates. Splenocytes were stimulated with 2 μg of E- or NS1-derived peptides or with Con A, and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 6 h. Brefeldin A (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, GolgiPlug BD Biosciences) was added to the cultures after an initial stimulation period of 1 h and 30 min. Cells were then collected and washed in staining buffer (PBS, 2% FCS, 2 mM EDTA, 55 μM β -mercaptoethanol), blocked with 10% inactivated murine serum in PBS for 30 min, fixed with 4.0% paraformaldehyde in PBS for 20 min at 4°C, washed in PBS, and then maintained at 4°C. On the next day, cells were stained with pre-titrated anti-CD3 PE (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-CD4 PerCP or APC (clone RM4-5, BD Biosciences) and anti-CD8 FITC or PerCP (clone 33-6.7, BD Biosciences), fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Cells were then stained for intracellular cytokine detection with anti-IFN- γ Alexa Fluor 488 (clone XMG12, BioLegend) and anti-TNF- α Alexa Fluor 647 (clone MP6-XT22, BD Biosciences). All antibodies were diluted in staining buffer. Cells were incubated for 30 min at 4°C, washed and maintained in staining buffer at 4°C until the next day. Fifteen thousand cells on the lymphocyte gate were acquired in a FACSCalibur (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software v.10 (TreeStar).

Statistical Analysis

All statistical differences were assessed using GraphPad Prism software v6.0, applying a minimum level of significance of 95%. Statistical significance was evaluated by the non-parametric Mann-Whitney test for ELISPOT and ICS assays. Morbidity comparisons were made using one-way ANOVA with Bonferroni correction. Survival rates were evaluated using the Log-Rank statistical test.

RESULTS

Protective Efficacy of pE1D2 and pcTPANS1 DNA Vaccines in BALB/c Mice

Protection conferred by the DNA vaccines based on the ectodomain of the envelope (pE1D2) and the NS1 (pcTPANS1) proteins was evaluated in BALB/c mice, after a lethal DENV2

challenge, inoculated by the i.c. route. Mice were followed for 21 days after challenge and compared to animals inoculated with the control plasmid pcTPA or to non-immunized mice, both also challenged with DENV2 (Table 1). Ninety-five percent of pE1D2-immunized mice survived the challenge, and only 15% presented clinical signs of infection. Immunization with pcTPANS1 also generated a high protection level of 85% survival, and only 20% of mice displayed morbidity. On the other hand, both pcTPA-inoculated and non-immunized mice (DENV2 group) presented low survival (30 and 20%, respectively) and high morbidity rates (90%; Table 1).

The protection elicited by the DNA vaccines was also measured by analyzing the signs of infection in the different experimental groups through a clinical score scale from 0 to 4. Following such analysis, both pE1D2 and pcTPANS1-immunized mouse groups presented the median clinical score of 0. In contrast, animals inoculated with the control pcTPA or non-immunized mice and challenged with DENV2 presented morbidity degrees of 3 and 4, respectively (Table 1). Overall, taking together survival and morbidity rates, our results highlight the protective potential of these DNA vaccines.

The Impact of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes on the Survival of Immunized Mice After Lethal Virus Challenge

We evaluated the contribution of T cell populations on the vaccine-induced protective immunity against DENV2 by treating pE1D2- and pcTPANS1-immunized BALB/c mice with anti-CD4 or anti-CD8 antibodies. On the challenge day, the success of the depletion protocol was confirmed (Supplementary Figure 1). Survival rates and signs of infection in immunized and treated mice were daily monitored for 21 days after DENV2 challenge. The schematic timeline with immunization, depletion and virus challenge is presented in Figure 1A.

In the pE1D2-immunized group, depletion of CD8⁺ cells resulted in a small reduction of survival rate, from 100 to 80%, with no statistical significance comparing to non-depleted animals (Figure 1B). However, CD8⁺ T cell depletion had an impact on the clinical signs of infection. In addition to mice that succumbed to infection (degree 4),

TABLE 1 | Survival and morbidity of BALB/c mice immunized with the DNA vaccines pE1D2 and pcTPANS1 after lethal challenge with DENV2.

Experimental group	Survival	Morbidity	Degree of morbidity
pE1D2	19 (95%)	3 (15%)	0 \pm 0.9
pcTPANS1	17 (85%)	4 (20%)	0 \pm 1.5
pcTPA	6 (30%)	18 (90%)	3 \pm 1.5
DENV2 (non-immunized)	4 (20%)	18 (90%)	4 \pm 1.3

Survival and morbidity, followed 21 days after virus challenge, were represented as the absolute number of individual events in the experimental group ($n = 20$) and the percentage it represents (in parentheses). The degree of morbidity was represented as the median \pm standard deviation of the mean.

other animals presented morbidity degrees ranging from 2 to 3 (**Figure 1C**). On the other hand, protection provided by pE1D2 was completely abolished after CD4⁺ T cells depletion. Similar to the control of non-immunized mice (DENV2 group), only 10% of pE1D2-vaccinated and anti-CD4-treated mice survived the virus challenge, which was statistically different from non-depleted or CD8⁺ T-cell depleted groups (**Figure 1B**). Furthermore, the only animal that survived virus infection presented morbidity degree of 2 (**Figure 1C**).

Similar results were observed in animals immunized with pcTPANS1 and depleted from CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes. Although not statistically significant, the survival rate of animals immunized with pcTPANS1 decreased from 80 to 50% when depleted from CD8⁺ T cells, while the impact of CD4⁺ T cell depletion was more significant, abolishing protection almost completely (only 10% survival; **Figure 1B**). Depletion of CD8⁺ T cells also increased morbidity, as more animals showed clinical signs of DENV infection, even though this difference was not statistically significant when compared to the pcTPANS1 non-depleted group (**Figure 1C**).

T Cell Epitope Map of E and NS1 Antigens by ELISPOT Assays in BALB/c Vaccinated Animals

After we observed that protection induced in BALB/c mice immunized with the pE1D2 and pcTPANS1 DNA vaccines depends on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we decided to identify the peptides contained in the E and NS1 proteins which were immunogenic in vaccinated animals. For this purpose, we used two synthetic peptide libraries spanning the ectodomain of the E protein and the whole sequence of NS1 protein from the dengue serotype 2, strain New Guinea C. Each peptide is 15 amino acids in length with an overlap of 11 amino acid residues. Immunogenicity of E and NS1-derived epitopes was assessed by IFN- γ ELISPOT assays, performed initially with peptide pools (8–10 peptides each) used to stimulate splenocytes from vaccinated and control animals, with cells also pooled in the different groups. After detection of positive pools, peptides were individually tested on splenocytes pooled from the different experimental groups and then evaluated with cells from individual animals. When two positive detected peptides were adjacent, we chose the peptide that generated the highest magnitude of the response. The initial ELISPOT analyses were performed using a low stringency parameter in which the response magnitude of ≥ 5 SFC per 5×10^5 cells were considered positive, after subtraction of the number of spots detected in non-stimulated cells and as long as above the observed in pcTPA-inoculated or naïve control groups. Concanavalin A was used as a non-specific positive control.

In order to investigate whether the immunodominant pattern of the E- and NS1-derived peptides could be altered after virus infection, we also evaluated the IFN- γ response with

cells collected from animals immunized with the pE1D2 or pcTPANS1 and challenged with DENV2. The schematic timeline with immunization, virus challenge and euthanasia is presented in **Figure 2A**.

The screening of E-derived peptide pools recognized by splenocytes from pE1D2-immunized BALB/c mice revealed 3 positive sets without the DENV2 challenge (pools 4, 8, and 9) and 4 more sets after virus infection (pools 2, 5, 7, and 10) for IFN- γ production (**Figure 2B**). Positive pools were then selected for individual peptide screening. Peptides E40, E71, E75, E82, and E83 were considered positive without the virus challenge (**Supplementary Figure 2**) by applying the same selection criteria as before and comparing to control (cells from pcTPA-inoculated animals). Given the adjacent localization of peptides E82 and E83 and the higher magnitude of response induced by the peptide E82, this peptide was selected for further analysis. The screening of individual peptides after the DENV2 challenge revealed that not all positive pools presented peptides able to stimulate IFN- γ production. Results reinforced peptides E40 and E82 as the most immunogenic, with the further addition of peptides E75, E84, E86, and E98 (**Supplementary Figure 2**). To further confirm the immune relevance of these peptides, we performed *in vitro* stimulation tests with cells from individual BALB/c mice. Results showed that peptides E40 and E82 significantly stimulated IFN- γ production in splenocytes collected from pE1D2-immunized mice when comparing to cell spots of pcTPA-inoculated or naïve animals stimulated with the same peptides (**Figure 2C**). These peptides were immunogenic in vaccinated-only mice as well as in immunized animals challenged with DENV2, although the response was higher after virus infection. Besides, both peptides were also able to elicit IFN- γ production in splenocytes collected from non-immunized mice infected with DENV2, although in a lower magnitude when compared to the pE1D2-immunized groups (**Figure 2C**). In contrast, the responses elicited by peptides E71, E75, E84, E86, and E98 were not significantly different from the negative controls. As expected, stimulation with Con A in all ELISPOT assays performed with cells from pE1D2-vaccinated or control animals induced high IFN- γ response.

The same screening analysis was used to evaluate the immunogenicity of NS1-derived peptides in the context of the pcTPANS1 DNA vaccine. Four peptide pools (pools 2, 5, 6, and 7) were able to elicit an IFN- γ response with magnitudes higher than or equal to 5 SFC per 5×10^5 cells in splenocytes collected from pcTPANS1-immunized mice without virus challenge, and three other pools (pools 4, 8, and 9) were identified as positive after dengue infection (**Figure 3A**). Individual peptide screening tests revealed 4 immunogenic peptides: N17, N46, N66, and N67 (**Supplementary Figure 3**). Considering the position of each immunogenic region, we selected peptides N17, N46, and N67 for the assays performed with cells from individual BALB/c mice without virus challenge. The IFN- γ responses elicited by all these three NS1-derived peptides were statistically higher when comparing cells from pcTPANS1-vaccinated and pcTPA-inoculated mice (**Figures 3B,C**). The response

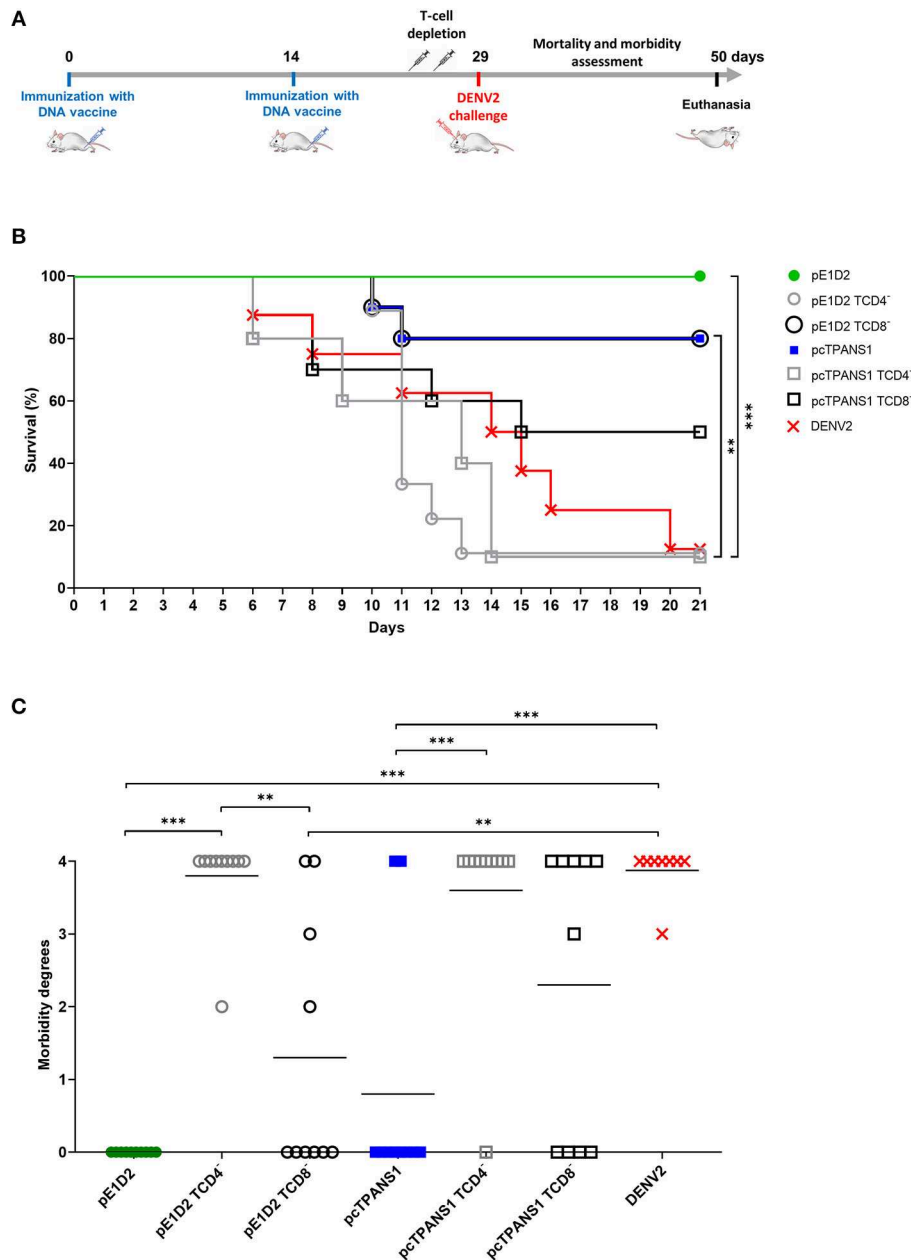


FIGURE 1 | Effects of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte depletion on survival and morbidity in animals immunized with pE1D2 or pcTPANS1 and challenged with DENV2. Schematic timeline representation of the experiment (A). BALB/c mice intramuscularly immunized with pE1D2 or pcTPANS1 (*n* = 10) were intraperitoneally inoculated with anti-CD4 or anti-CD8 antibodies at days 4 and 2 prior to intracerebral virus challenge (40 × LD₅₀ of a neuroadapted DENV2). The control group (DENV) consisted of non-immunized mice (*n* = 8) inoculated with DENV2. All experimental groups were monitored for 21 days after challenge to record the survival rates (B) and degree of morbidity (C). Asterisks indicate significant differences using Log-Rank (Mantel-Cox) test in (B) or one-way ANOVA test in (C) (**p* < 0.05; ***p* < 0.001; ****p* < 0.0001). Lines in (C) represent the median of each group.

against these NS1-derived peptides also increased after virus challenge, mainly regarding peptides N17 and N67. Besides, we observed that the number of immunogenic peptides increased after virus challenge. Peptides N12, N14-20, N35, N41, N43, N46-50, N64, N66, N67, N71, N72, N76, and N69 were considered positive by applying our selection

criteria (Supplementary Figure 3). Nevertheless, the ELISPOT assays performed with cells from individual BALB/c mice and the selected NS1-derived peptides revealed that only 7 peptides (N12, N17, N18, N35, N41, N46, and N67) were able to stimulate an IFN-γ response significantly higher in splenocytes collected from mice immunized with pcTPANS1

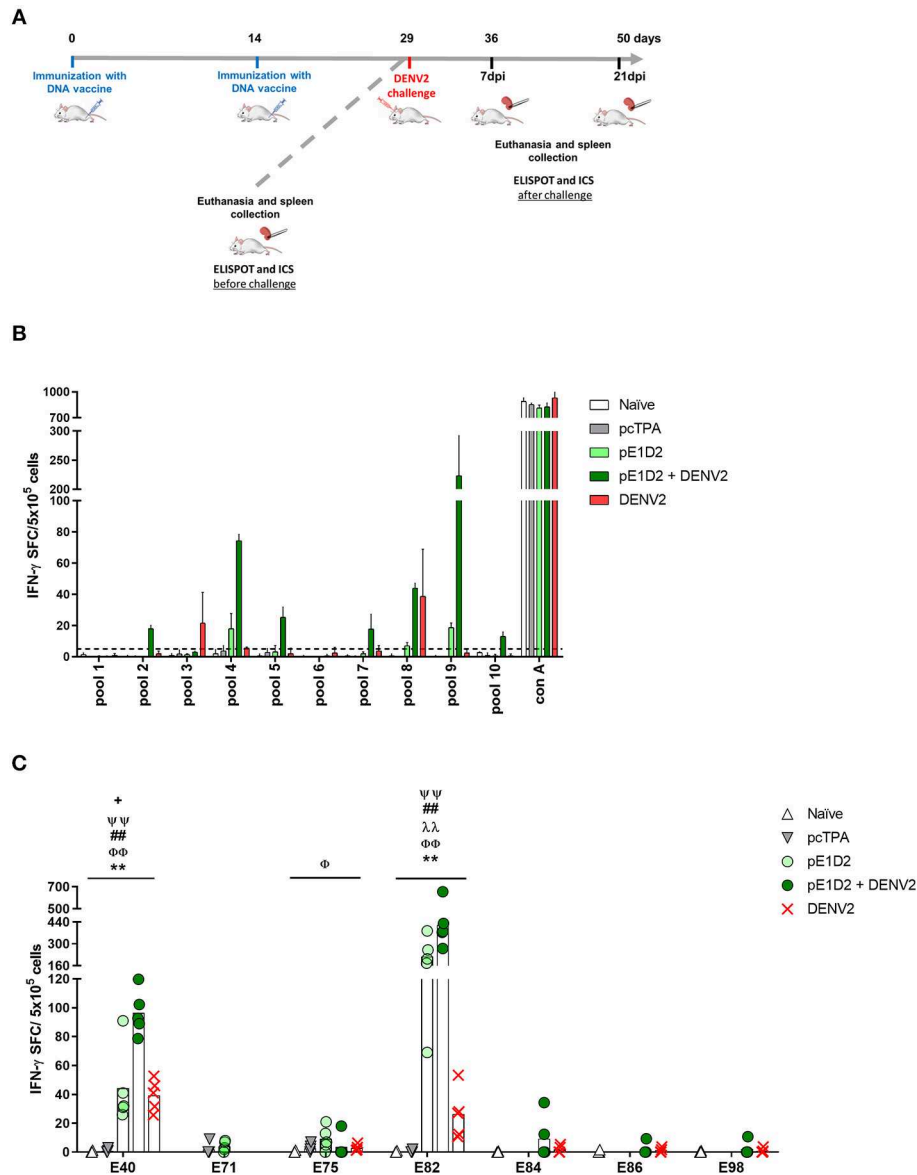


FIGURE 2 | T cell E-derived peptide identification in pE1D2-immunized BALB/c mice by IFN- γ ELISPOT assays. Schematic timeline representation of the experiment (A). Splenocytes isolated from pE1D2-immunized BALB/c mice ($n = 3$, pooled), challenged or not with a neuroadapted DENV2 strain (NGC), were stimulated with E-derived peptides for 18 h, and the number of cells producing IFN- γ was measured by ELISPOT assay. Peptides and cells were evaluated in pools (B) and positive peptides were confirmed by tests performed with cells from individual mice ($n = 5$) (C). ELISPOT assays were performed using splenocytes collected 15 days following DNA inoculation (gray and light green bars/dots) or 21 (B) and 7 days post-infection (C) (dark green bars/dots). Cells from naïve or pcTPA-inoculated mice were used as negative controls (B,C). The horizontal dotted lines represent the cut-off selection point (≥ 5 SFC/ 5×10^5 cells) (B). Bars represent the mean plus standard deviation of triplicate data in (B) and the means of each group in (C). Symbols represent significant differences between groups, using non-parametric two-tailed Mann-Whitney statistical tests: * pcTPA- vs. pE1D2-inoculated mice; # naïve animals vs. pE1D2-immunized mice after DENV2 challenge; + pE1D2-immunized mice vs. pE1D2-immunized animals after DENV2 challenge; ϕ naïve animals vs. DENV2 challenged mice; λ pE1D2-immunized mice vs. DENV2 challenged animals; Ψ pE1D2-immunized animals challenged with DENV2 vs. DENV2 challenged mice. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.001$; three symbols: $p < 0.0001$.

and challenged with DENV2, when comparing to cells obtained from naïve or only DENV2 infected animals (Figures 3B,C). Interestingly, only the N17 and N67 peptides were able to induce production of IFN- γ in cells collected from non-immunized animals challenged with DENV2. As expected, stimulation with Con A in all ELISPOT assays performed with cells from pcTPANS1-vaccinated or control animals induced high IFN- γ response.

Phenotyping T Cells That Recognized the Immunogenic E- and NS1-Derived Peptides

We next characterized the peptide-specific responses by investigating IFN- γ and TNF- α production in ICS assays performed with splenocytes collected from BALB/c mice immunized with the pE1D2 or pcTPANS1 DNA vaccines, before

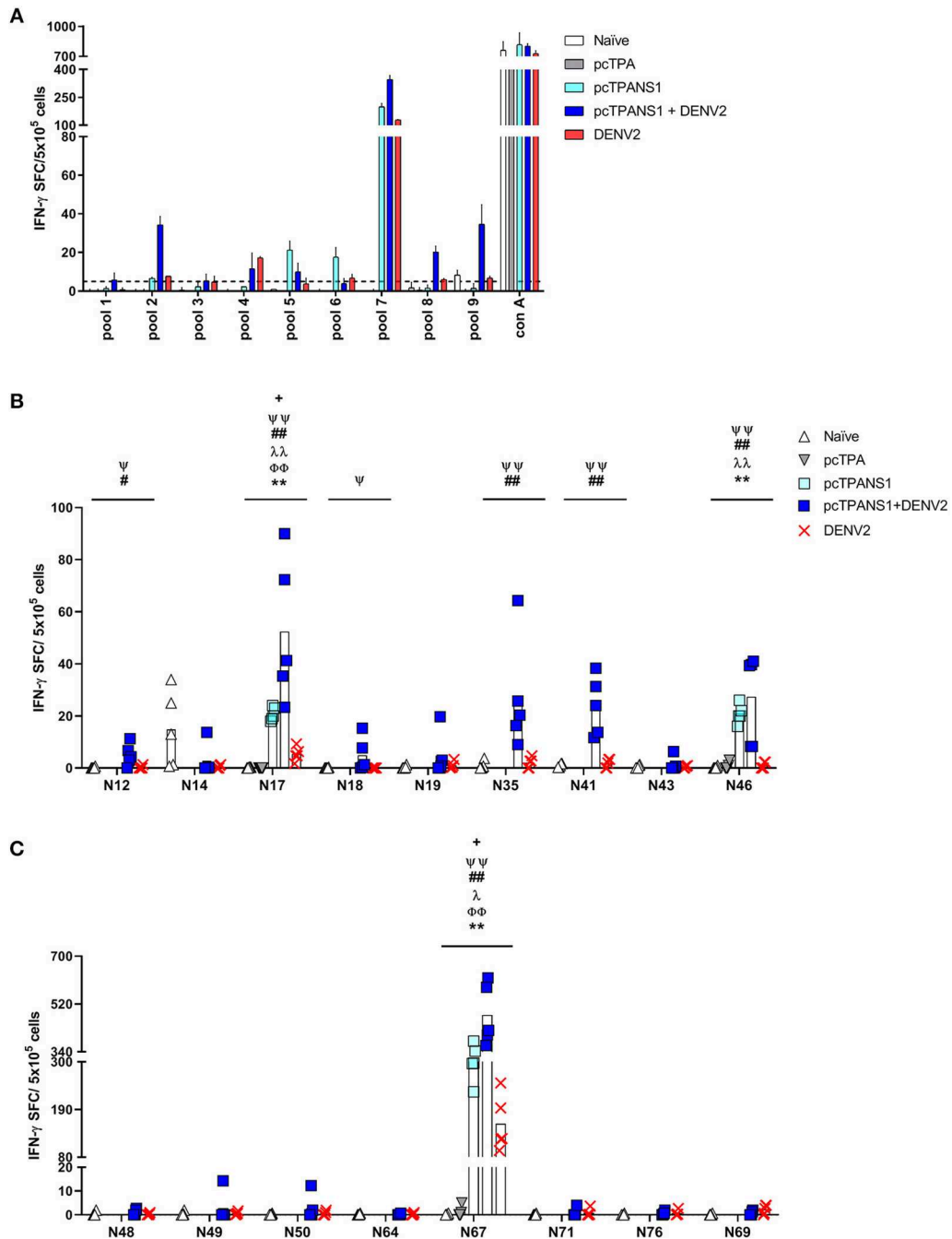


FIGURE 3 | T cell NS1-derived peptide identification in pcTPANS1-immunized BALB/c mice by IFN- γ ELISPOT assays. Immunizations, virus challenge and euthanasia were outlined in **Figure 2A**. Splenocytes isolated from pcTPANS1-immunized BALB/c mice ($n = 3$, pooled), challenged or not with DENV2, were stimulated with NS1-derived peptides for 18 h, and the number of cells producing IFN- γ was measured by ELISPOT assay. Peptides and cells were evaluated in pools **(A)** and positive peptides were confirmed by tests performed with cells from individual mice ($n = 5$) **(B,C)**. ELISPOT assays were performed using splenocytes collected 15 days following DNA inoculation (gray and light blue bars/dots) or 21 **(A)** and 7 days post-infection **(B,C)** (dark blue bars/dots). Cells from naïve or pcTPA-inoculated mice were used as negative controls. The horizontal dotted lines represent the cut-off selection point (≥ 5 SFC/5 $\times 10^5$ cells) **(B,C)**. Bars represent the mean plus standard deviation of triplicate data in **(A)** and the means of each group in **(B,C)**. Symbols represent significant differences between groups, using non-parametric two-tailed Mann-Whitney statistical tests: * pcTPA- vs. pcTPANS1-inoculated mice; # naïve animals vs. pcTPANS1-immunized mice after DENV2 challenge; + pcTPANS1-immunized mice vs. pcTPANS1-immunized animals after DENV2 challenge; Φ naïve animals vs. DENV2 challenged mice; λ pcTPANS1-immunized mice vs. DENV2 challenged animals; Ψ pcTPANS1-immunized animals challenged with DENV2 vs. DENV2 challenged mice. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.001$; three symbols: $p < 0.0001$.

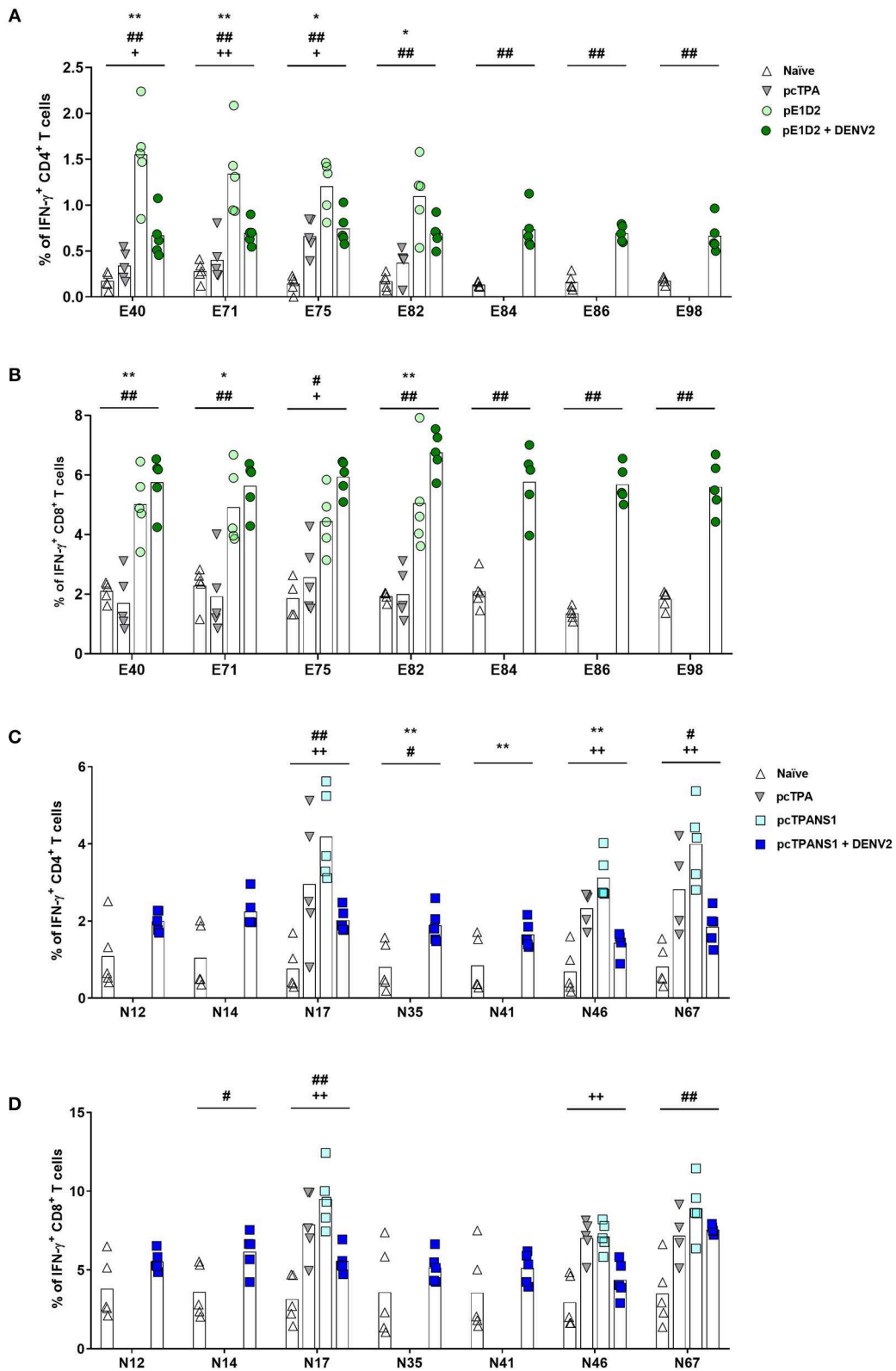


FIGURE 4 | Frequencies of IFN- γ -producing T cells after stimulation with E- or NS1-derived peptides by ICS assays. Immunizations, virus challenge, and euthanasia were outlined in **Figure 2A**. Splenocytes isolated from BALB/c mice immunized with pE1D2 or pcTPANS1 ($n = 5$), challenged or not with DENV2, were stimulated (Continued)

FIGURE 4 | with E- (**A,B**) or NS1-derived peptides (**C,D**) for 6 h and INF- γ production was detected by ICS assay. Peptides were selected according to previous ELISPOT results, and splenocytes were harvested 15 days following DNA inoculation or 7 days post-infection. Numbers indicate CD4⁺ (**A,C**) or CD8⁺ T cells (**B,D**) producing INF- γ as a percentage of total splenocytes. Cells from naïve or pcTPA-inoculated mice were used as negative controls. Bars represent the means of each group. Symbols represent significant differences between groups, using non-parametric two-tailed Mann-Whitney statistical tests: * pcTPA- vs. pE1D2- or pcTPANS1-inoculated mice; # naïve animals vs. pE1D2- or pcTPANS1-immunized mice after DENV2 challenge; + pE1D2- or pcTPANS1-immunized mice vs. pE1D2- or pcTPANS1-immunized animals after DENV2 challenge. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.001$; three symbols: $p < 0.0001$.

and after virus challenge. Following a brief stimulation with the peptides selected by our ELISPOT assays, we examined the intracellular cytokine production by CD4⁺ or CD8⁺ T cell populations. The flow cytometry gate strategy applied to this analysis is described in **Supplementary Figures 4, 5**.

The ICS performed with E-derived peptides revealed the involvement of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in INF- γ production by splenocytes collected from pE1D2-immunized mice (**Figures 4A,B**). Almost all tested peptides induced INF- γ responses in cells obtained from vaccinated animals significantly higher when compared to the response observed in lymphocytes from pcTPA-inoculated mice. The peptide E40 elicited the highest number of CD4⁺ T cells producing INF- γ (1.5%), an increase of 4.5 times compared to the control group (**Figure 4A**). This peptide also led to high frequencies of INF- γ -producing CD8⁺ T cells collected from immunized mice, although peptide E82 was the most immunogenic, with a 5% INF- γ ⁺ CD8⁺ T cell frequency (2.5-fold increase compared to cells from pcTPA-inoculated animals; **Figure 4B**). In general, the INF- γ response in CD4⁺ T cells upon stimulation with all the selected peptides decreased after virus infection (average frequency from 1.5 to 0.7%, with a 2.1-fold decrease), while the frequencies of INF- γ ⁺ CD8⁺ T cells increased (average frequency of 4.7–6.0%, with a 1.3-fold increase; **Figures 4A,B**).

We further investigated the immune response elicited by the NS1-derived peptides by characterizing INF- γ production by ICS assays performed with splenocytes from pcTPANS1-vaccinated mice. We also observed the production of this cytokine by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Although CD4⁺ T lymphocytes responded to almost all tested peptides, CD8⁺ T cells responded only to some of them (peptides N14, N17, and N67) after the dengue infection (**Figures 4C,D**). In terms of statistical significance, the peptide N67 was more immunogenic leading to a 4% INF- γ ⁺ CD4⁺ T cell frequency (1.4-fold increase compared to the control pcTPA; **Figure 4C**). Peptide N17 also induced high frequencies of CD4⁺ T cells expressing INF- γ , although not statistically significant compared to the pcTPA group. Overall, in the context of the pcTPANS1 DNA vaccine, the percentage of T cells expressing INF- γ seemed to have been reduced after the infection with DENV2 (**Figures 4C,D**).

We also evaluated TNF- α production upon stimulation with the same E- and NS1-derived peptides. After the infection with DENV2, all E-derived peptides induced a TNF- α response in CD4⁺ and CD8⁺ T cells collected from pE1D2-vaccinated animals, except for CD8⁺ T lymphocytes stimulated with the peptide E98 (**Figures 5A,B**). Without the virus challenge, on the other hand, an increase in the TNF- α production was not statistically detected, except for CD8⁺ T cells upon stimulation with peptide E71. Concerning the pcTPANS1

vaccine, a remarkable difference in levels of TNF- α production was not detected by the ICS assays using cells from vaccinated animals, challenged or not with DENV2 (**Figures 5C,D**). The only peptides able to induce TNF- α expression were N17 in CD4⁺ T cells and N67 in CD8⁺ T cells.

Results from the screening of E- and NS1-derived peptides and production of INF- γ and TNF- α are summarized in **Table 2**, as well as their amino acid sequences and location on the E and NS1 proteins.

T Cell Epitope Map of E and NS1 Proteins in C57BL/6 Mice

In addition to studies with BALB/c animals, we also investigated the immunodominance of E- and NS1-derived peptides in the context of a different MHC haplotype expression. For this purpose, we immunized C57BL/6 mice with pE1D2 and pcTPANS1 DNA vaccines and evaluated the INF- γ response by ELISPOT assays using the same E and NS1 peptide libraries. Following the low stringent analysis performed before, peptide pools that elicited a magnitude of response higher or equal to 5 SFC per 5×10^5 cells were considered positive.

A total of 4 E-derived peptide pools were identified as positive for stimulating INF- γ production (pools 1, 6, 7, and 9) and were selected for individual peptide screenings (**Figure 6A**). Peptides E01, E02, E59, E60, E65-67, E87, and E88 were able to induce an INF- γ response in splenocytes collected from animals vaccinated with pE1D2 (**Figure 6B**).

Similarly, 5 NS1-derived peptide pools (pools 1, 2, 4, 6, and 7) were able to stimulate INF- γ production in cells collected from C57BL/6 mice immunized with the pcTPANS1 DNA vaccine (**Figure 7A**). Individual peptide screenings revealed that peptides N08, N16-18, N20, N33-36, N56, and N62 elicited INF- γ expression in splenocytes obtained from pcTPANS1-immunized C57BL/6 mice (**Figure 7B**). These results revealed that peptides N17 and N35 were immunogenic in the context of the two different evaluated MHC haplotypes, i.e., in BALB/c and in C57BL/6 mice.

DISCUSSION

In this study, we evaluated the contribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells for the protection induced in mice by DNA vaccines encoding the ectodomain of the envelope (pE1D2) and the non-structural 1 (pcTPANS1) proteins from DENV2. We also identified the T cell immunogenic peptides in vaccinated animals by the production of INF- γ and TNF- α . We have described the DNA vaccines construction elsewhere (33, 40) and in the present work, we confirmed protection elicited in immunocompetent BALB/c mice challenged with a

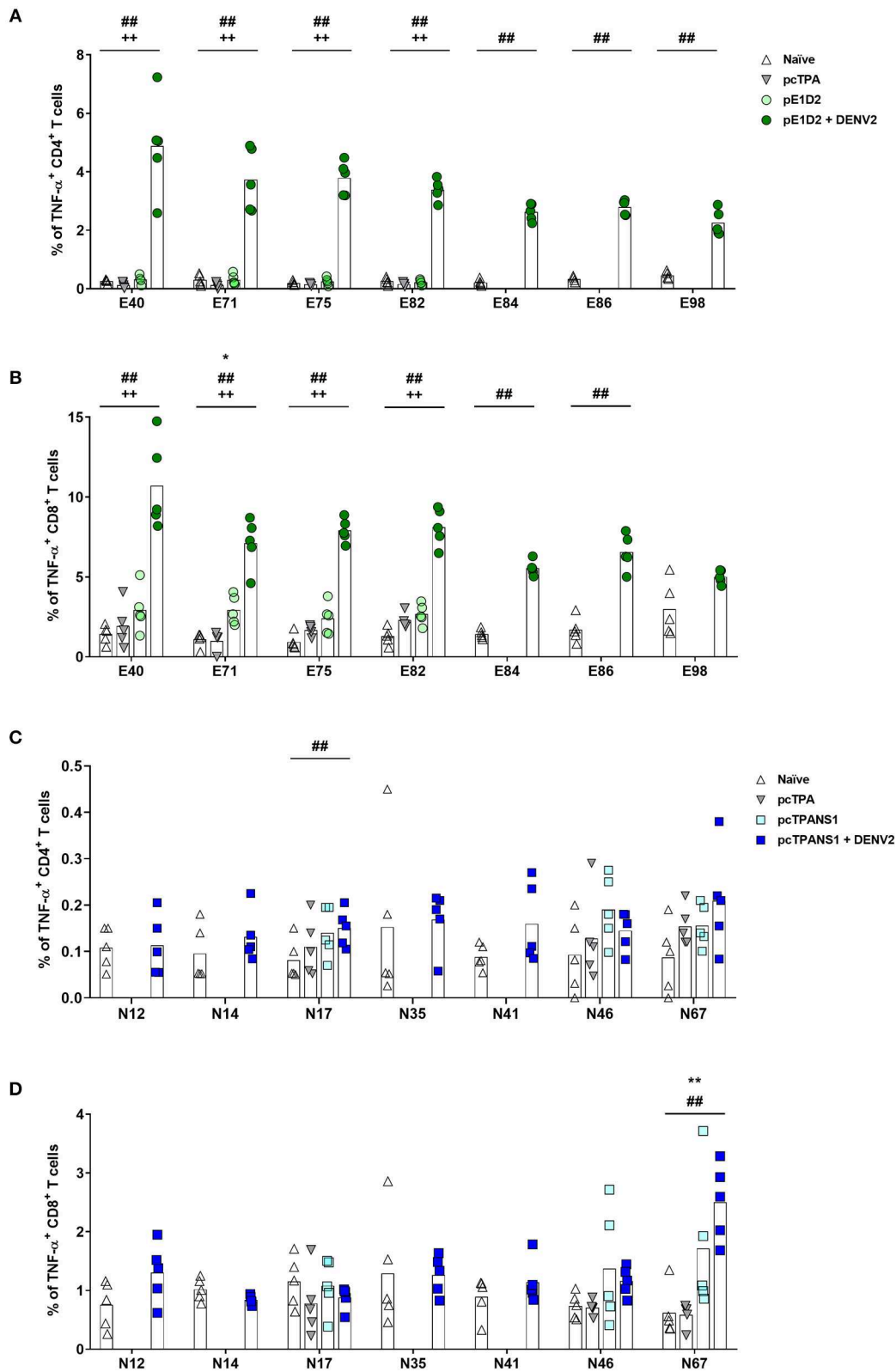


FIGURE 5 | Frequencies of TNF- α -producing T cells after stimulation with E- or NS1-derived peptides by ICS assays. Immunizations, virus challenge, and euthanasia were outlined in **Figure 2A**. Splenocytes isolated from BALB/c mice immunized with pE1D2 or pcTPANS1 ($n = 5$), challenged or not with DENV2, were stimulated (Continued)

FIGURE 5 | with E- (A,B) or NS1-derived peptides (C,D) for 6 h and TNF- α production was detected by ICS assay. Peptides were selected according to previous ELISPOT results, and splenocytes were harvested following DNA inoculation or 7 days post infection. Numbers indicate CD4⁺ (A,C) or CD8⁺ T cells (B,D) producing TNF- α as a percentage of total splenocytes. Cells from naïve or pcTPA-inoculated mice were used as negative controls. Bars represent the means of each group. Symbols represent significant differences between groups, using non-parametric two-tailed Mann-Whitney statistical tests: * pcTPA- vs. pE1D2- or pcTPANS1-inoculated mice; # naïve animals vs. pE1D2- or pcTPANS1-immunized mice after DENV2 challenge; + pE1D2- or pcTPANS1-immunized mice vs. pE1D2- or pcTPANS1-immunized animals after DENV2 challenge. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.001$; three symbols: $p < 0.0001$.

TABLE 2 | Characteristics and summary results of E and NS1 positive peptides.

Envelope peptides	Sequence	Location	IFN- γ ELISPOT Score			% of IFN- γ ⁺ T cells				% of TNF- α ⁺ T cells			
			pE1D2	pE1D2 +DENV2	DENV2	pE1D2		pE1D2 +DENV2		pE1D2		pE1D2 + DENV2	
						CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
E40	KHGKEIKITPQSSIT	157–171	++	+++	++	1.55	5.01	0.67	5.76	0.32	2.94	4.89	10.7
E71	GHLKCRFLRMDKLQK	281–295	NS	–	–	1.34	4.92	0.69	5.63	0.31	2.92	3.73	7.11
E75	MSYSMCTGKFKVWKE	297–311	NS	NS	NS	1.21	4.45	0.75	5.94	0.25	2.4	3.79	7.91
E82	QYEGDGGSPCKIPFEI	325–339	+++	+++	++	1.1	5.06	0.69	6.76	0.22	2.67	3.39	8.12
E84	CKIPFEIMDLEKRHV	333–347	–	NS	NS	–	–	0.74	5.77	–	–	2.62	5.55
E86	DLEKRHVLGRLITVN	341–355	–	NS	NS	–	–	0.69	5.68	–	–	2.8	6.55
E98	QLKLNWFKKGSSIVI	386–400	–	NS	NS	–	–	0.66	5.6	–	–	2.25	5.01
NS1 peptides	Sequence	Location	pcTPANS1	pcTPANS1 + DENV2	DENV2	pcTPANS1		pcTPANS1 + DENV2		pcTPANS1		pcTPANS1 + DENV2	
						CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
						CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
N12	AIQKAHEEGIGIRS	45–59	–	+	NS	–	–	2.0	5.55	–	–	0.11	1.3
N14	GICGIRSVTRLENLM	53–67	–	NS	NS	–	–	2.24	6.15	–	–	0.13	0.84
N17*	NLMWKQITPELNHIL	65–79	++	+++	+	4.19	9.5	2.02	5.56	0.14	1.08	0.15	0.88
N35*	GPETAACPNTNRAWN	137–151	–	++	NS	–	–	1.89	5.17	–	–	0.17	1.26
N41	GVFTTNIWKLREKQ	161–175	–	++	NS	–	–	1.65	5.13	–	–	0.16	1.14
N46	SKLMSAAIKDNRAVH	181–195	++	++	NS	3.13	7.12	1.43	4.38	0.19	1.37	0.14	1.16
N67	AGPWHLGLKLEMDDFD	265–279	+++	+++	+++	3.99	8.92	1.85	7.56	0.15	1.71	0.21	2.5

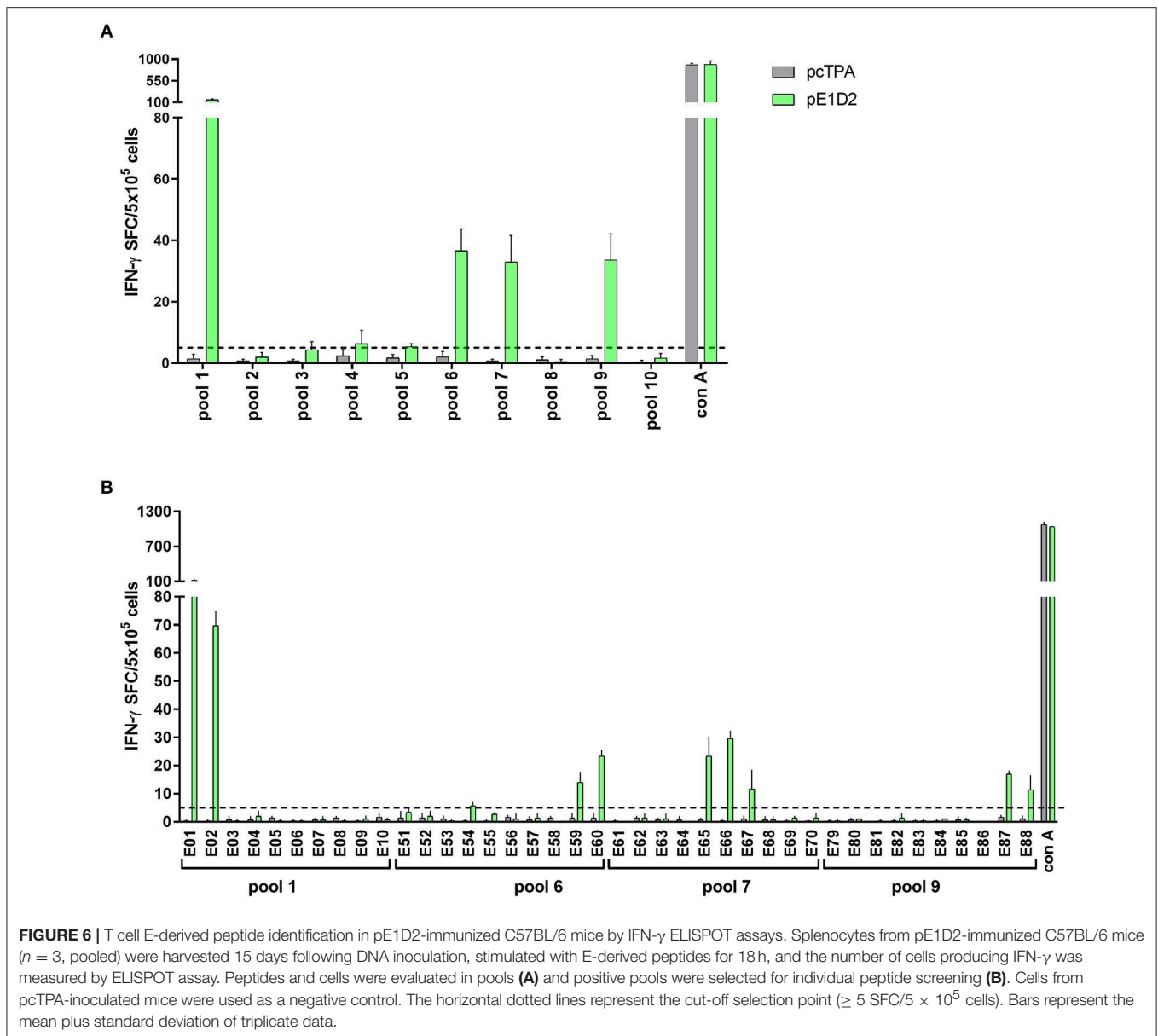
The location of positive peptides was determined according to the amino acid sequence of E and NS1 proteins from NGC DENV2. Results from IFN- γ ELISPOT assays performed with cells from individual mice are displayed according to the following arbitrary scale: (+): ≥ 5 to 20; (++) : 21 to 50, (+++) : 51 to 100, (++++) : ≥ 100 SFC/5 $\times 10^5$ cells. % of IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ T cells are represented as mean ICS frequencies. (.) Peptides also positive in IFN- γ ELISPOT with cells from C57BL/6 mice. (–): means non-existent data; (NS): non-statistical.

neuroadapted NGC DENV2. Almost all immunized animals survived virus infection with none or low morbidity degrees. The murine model of BALB/c mice inoculated with DENV2 by the i.c. route is well-established in our laboratory and provides a straightforward readout parameter for vaccine testing. Therefore, in order to expand the knowledge about the different arms of the immune system that may act on the protection against DENV, we investigated in BALB/c mice the role of the T cell response elicited by the DNA vaccines we have constructed. We observed that the CD4⁺ T lymphocytes response was essential for protection generated by both vaccines, although depletion of CD8⁺ T cells also impacted in survival and morbidity after virus challenge. In keeping with these results, we have previously shown that pcTPANS1-vaccinated animals exhibited a significant increase of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen and blood circulation after the DENV2 challenge (44).

Our group has also reported the importance of CD4⁺ T cells in pcTPANS1-immunized mice in a study showing that

these lymphocytes in association with anti-NS1 antibodies are fundamental for protection (39). In addition, the CD4⁺ T cells induced by the pcTPANS1 vaccine seem to act by a different mechanism than helping B-cell antibody production. In fact, our previous study with adoptive transfer of CD4⁺ T cells combined with NS1 antiserum, both obtained from vaccinated mice, led to the protection of recipient BALB/c animals after challenge with DENV2, with survival rates not significantly different from those observed in pcTPANS1-immunized mice (39). Since recipient animals did not receive B cells, only CD4⁺ T cells and antibodies, the mechanism involved in the protection mediated by these T cells must be other than helping B lymphocytes.

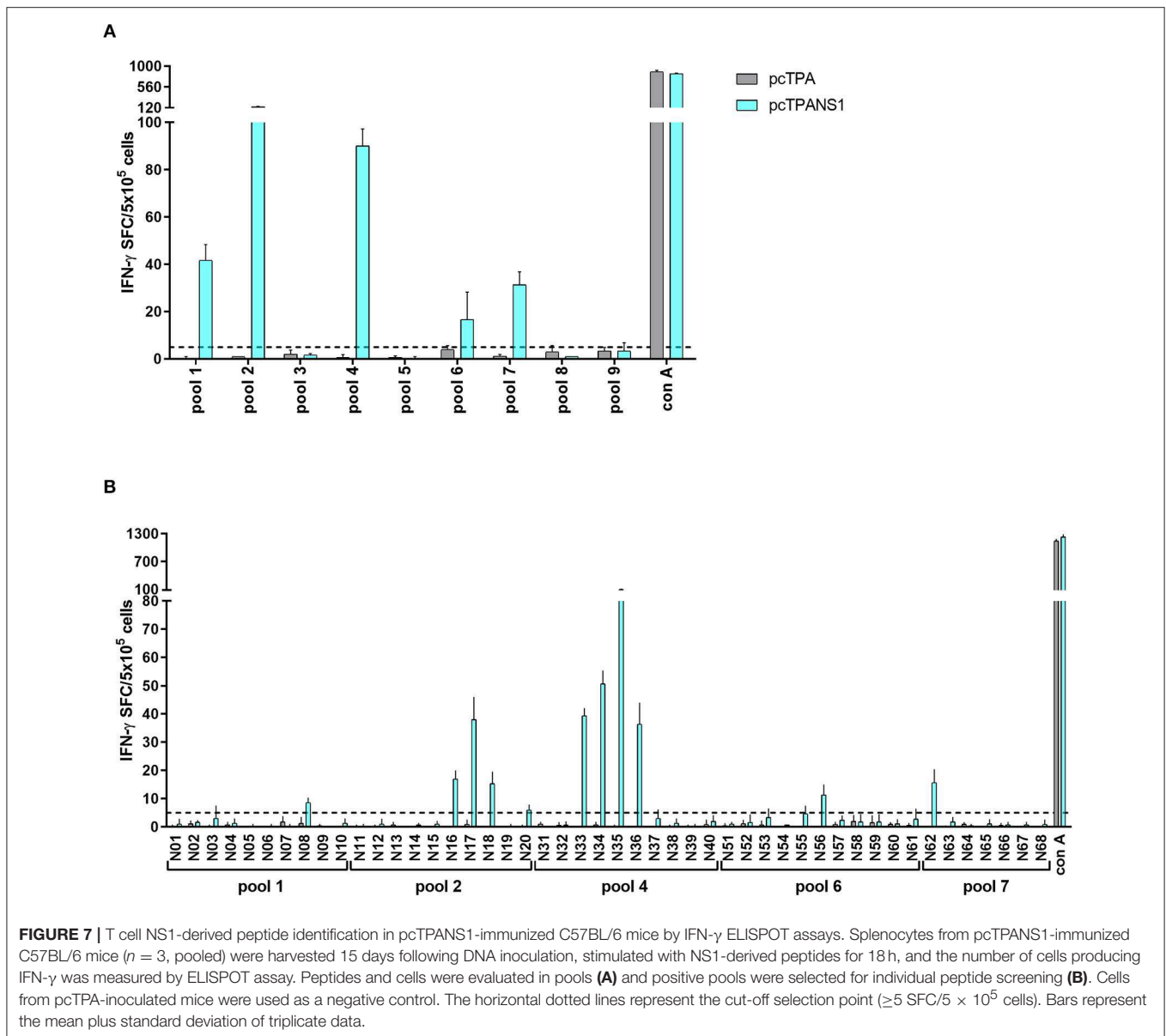
On the other hand, several studies have pointed out the importance of CD8⁺ T cells in controlling DENV infection, either in mouse models or in humans (16, 17, 19, 45–47). Yet, other reports suggest the involvement of CD4⁺ T lymphocytes in the protection provided by experimental vaccines (25, 28). Yauch and colleagues showed that CD8⁺ T cells played an essential role



in viral clearance, while CD4⁺ T lymphocytes were not required to control primary DENV2 infection in IFN- α/β R^{-/-} C57BL/6 mice. However, immunization with CD4⁺ T cell epitopes conferred protection by reducing viral load after challenge, thus supporting the importance of CD4⁺ T cell induction by vaccination (25). Besides, activation of cytotoxic CD4⁺ T cells has been reported after DENV infection, which seems to be associated with protective immunity (18, 48). Additionally, CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitope reactivities against DENV2 was investigated in patients experiencing secondary DENV infection (27). Authors observed that CD8⁺ T cells preferentially targeted epitopes contained in the NS3 and NS5 proteins, while CD4⁺ T lymphocytes recognized mainly epitopes derived from the virus envelope, capsid, and NS1 proteins. Nevertheless, another study suggested that the hierarchy of immunodominance

between the different DENV proteins depends on the virus serotype (47).

Mouse models have been essential in determining the T cell epitopes involved in the protection and/or the pathogenesis of dengue infections (46). Our study conducted in an immunocompetent mouse model revealed that the pE1D2 and pcTPANS1 DNA vaccines were able to induce T cell responses targeting both E and NS1 proteins. The T cell epitopes were screened by ELISPOT and ICS assays for IFN- γ production in splenocytes from vaccinated mice, using 15-mer synthetic peptide libraries with 11 amino acid residues overlapping, spanning the E and NS1 proteins. The sets of peptides of 15 amino acids length were chosen since they can efficiently stimulate both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (49). The assays to measure IFN- γ response were selected since several reports



indicate that the production of this cytokine contributes to protection against DENV in animal models as well as in humans (25, 50, 51). The screening of T cell epitopes was also assessed in C56BL/6 mice immunized with the pE1D2 and pcTPANS1 vaccines in order to investigate the T cell response in the context of a different MHC haplotype expression. However, this mouse strain is not susceptible to our neuroadapted DENV2 sample. Therefore, experiments were not performed after virus challenge.

We identified 4 and 7 E-derived epitopes in pE1D2-vaccinated BALB/c animals before and after virus challenge, respectively (Table 2). Five of these peptides (E75, E82, E84, E86, and E98) are located in domain III of the E protein. This domain is also an important target for induction of neutralizing antibodies during virus infection (23), which is another fundamental arm of the immune response against DENV and therefore an essential

region for vaccine designs. Besides, peptides E40 and E82 were immunodominant in our study, leading to a significantly higher IFN- γ production in vaccinated animals, challenged or not with DENV2, as well as in mice only infected with the virus. Peptide E82 contains the sequence SPCKIPFEI, which was the first immunodominant epitope described for H-2^d-restricted CD8⁺ T cells in DENV2 infected mice (BALB/c) (52). As far as we know, our study is the first to identify the region present in the E40 peptide as immunodominant for T cell response.

Studies using different murine models have also identified an immunogenic T-cell epitope contained in peptides E86/E87 (amino acids 345–359) (28, 53). Chen and colleagues described a CD4⁺ T cell epitope between amino acids 349–363 in BALB/c mice immunized with a tetravalent DNA vaccine based on the domain III of the DENV envelope protein (28). On the other

hand, Li and colleagues observed that one epitope present in the peptide E87 (between amino acids 345–359) can stimulate IFN- γ production in cells obtained from C57BL/6j mice infected with DENV2 (53). In our study, analyzing peptides recognized by T cells from C57BL/6 mice immunized with the pE1D2 DNA vaccine, the peptide E87 was also immunogenic for induction of IFN- γ production, although the response to this peptide was not immunodominant. Thus, the region comprising E86/E87 peptides is able to stimulate lymphocytes from mice with the distinct haplotypes H-2^d and H-2^b.

Further reports, using transgenic mice with human leucocyte antigen (HLA) and infected with DENV, also identified a CD8⁺ T cell epitope contained in E86/E87 sequence, in addition to another epitope present in the peptide E75, likewise immunogenic in pE1D2-immunized BALB/c animals (26, 54). Regarding human T cell recognized epitopes, most of the E epitopes mapped in pE1D2-vaccinated animals have also been identified in DENV-infected patients (E71, E75, E82, E84, E86, and E98) and in volunteers who received a live attenuated tetravalent vaccine (E75) (17, 55). Therefore, our results together with published data reveal the potential of these E-derived regions to induce a T cell response that may be involved in protection against DENV.

On the other hand, studies on NS1 are less abundant. Our mapping of NS1 epitopes identified 3 and 7 immunogenic peptides in pcTPANS1-vaccinated mice, before and after DENV2 infection, respectively (Table 2). The N67 peptide was the immunodominant epitope, inducing high IFN- γ production, in agreement with another report that evaluated the response induced in BALB/c mice immunized with an adenovirus-based vaccine containing the DENV2 NS1 gene (56). Authors identified the CD8⁺ T cell immunodominant epitope AGPWHLGKL, which is contained in the N67 peptide and is highly conserved among strains of the four DENV serotypes. In addition, a screening of T cell epitopes derived from structural and non-structural proteins of DENV3 in HLA-transgenic mice and validated using T cells from human DENV3 immune volunteers detected an epitope contained in N17/N18 peptides that activated T-cell memory (57). In our studies, the N17 peptide was immunogenic in BALB/c animals before and after virus infection, as well as in C57BL/6 mice. Another evaluation using DENV2-infected HLA-transgenic mice revealed one peptide able to induce high levels of IFN- γ , which sequence is contained in peptide N41 (54). Moreover, human studies in Nicaragua with subjects previously infected with DENV, and in volunteers who received a live attenuated tetravalent vaccine, mapped some NS1-derived T cell epitopes, including sequences contained in the peptides N17, N41, and N67 (17, 55). Besides, one report with adult patients experiencing secondary DENV infection identified CD8⁺ T cell epitopes by ELISPOT assay and ICS contained in N41 and N48 peptide sequences (27).

Apart from evaluating the IFN- γ response induced by the screened E- and NS1-derived peptides, we also investigated TNF- α production in splenocytes from immunized animals stimulated with the previously selected peptides. Only one peptide (E71) was able to induce TNF- α production in pE1D2-vaccinated BALB/c mice without virus challenge. In contrast, almost all tested

E-derived peptides led to a TNF- α response after the DENV infection either in CD4⁺ or CD8⁺ T cells. Elevated levels of TNF- α and soluble TNF- α receptors have been reported in severe cases of dengue (58, 59). Since this cytokine is involved in cellular apoptosis and increased vascular permeability, its association with dengue severity has been extensively studied, reviewed by Pang et al. (60), Srikiatkachorn et al. (61), and Kuczera et al. (62). However, the correlation between TNF- α production and the outcome of dengue disease is still uncertain. Some reports analyzing dengue-infected patients have not observed a significant difference between TNF- α levels from dengue fever and severe dengue (63–65).

Regarding the NS1 protein, we only observed a significant increase in TNF- α ⁺CD8⁺ T cells from pcTPANS1-immunized mice after stimulation with the peptide N67. Interestingly, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from pcTPANS1-vaccinated animals after virus challenge maintained ordinary TNF- α production by stimulation with almost all NS1-derived peptides. Considering the increase of TNF- α as a deleterious effect of DENV infection, our results regarding the pcTPANS1 vaccine suggest a protective effect by inhibiting the production of such cytokine. On the other hand, analysis of polyfunctional T cell responses has drawn attention for vaccine development against flavivirus, suggesting that T lymphocytes producing multiple cytokines including IFN- γ , TNF- α , CD107a, and IL-2 are the most effective in controlling the virus (17, 18, 48, 66, 67).

In the present work, we only investigated protection against homo-typic infection. It is well-known that the severe form of the dengue disease is usually associated with hetero-typic infection, and it is a consensus that a dengue vaccine must be protective against the four DENV serotypes. Therefore, other studies will be necessary in order to evaluate the cross-reaction of the identified peptides against other DENV serotypes and its association with protection or pathogenesis. Besides, it will be likewise important to investigate whether the T cell responses induced by our DNA vaccines based on the envelope and NS1 proteins are multifunctional, as well as to examine the involvement of the identified peptides in the protection conferred by these vaccines. Our previous studies with the pE1D2 and pcTPANS1 vaccines also pointed out the importance of antibodies in protection, including the production of neutralizing antibodies against the E protein. Taking together with the results shown in the present work, we believe that the efficiency of these DNA vaccines is the combination of both arms of the immune system, the humoral and cellular immune response. Consequently, the knowledge of dominant epitopes targeted by CD4⁺ and CD8⁺ T cells might be essential for elucidating the mechanism involved in protection, resulting in more effective vaccines against dengue as well as against other flaviviruses.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out under ethical principles in animal experimentation stated by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Ethical Committee of Animal Use of Oswaldo Cruz Institute in Fiocruz (CEUA-IOC approval ID: L039/2015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PP, MA, SC, and AA conceived and designed the experiments. PP, MA, AP, LL, KQ, BP, and SC performed the experiments. PP, MA, AV, SC, and AA analyzed the data. PP, MA, SC, and AA wrote the paper. AV revised the paper. All authors approved the final copy of the manuscript.

FUNDING

The work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) (grant number: 443712/2014-0), the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (grant number: E-26/110.519/2010), the Research Program for the Unified Health System (PPSUS) (grant number: E-26/110.271/2014), the National Institute of Science and Technology in Vaccines (INCTV) (grant number: 573547/2013), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (grant number: 88882.332560/2019-01), and the Oswaldo Cruz Institute (IOC-Fiocruz).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the ELISPOT Platform of Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and the Flow Cytometry Platform of Oswaldo Cruz Institute (IOC-Fiocruz) for its technical assistance. We are also grateful to the Center of Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Institute (CEA/IOC).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01522/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | CD4⁺ and CD8⁺ T cell depletion in BALB/c mice. Representative flow cytometry dot plots displaying CD4⁺ and CD8⁺ T cell frequencies in blood samples from T-cell depleted mice. Animals treated intraperitoneally with anti-CD4 or anti-CD8 antibodies were evaluated on the challenge day to verify the success of the depletion protocol. Blood samples were stained with anti-CD3 PE, anti-CD4 APC, and anti-CD8 FITC. The CD3⁺

population was backgated on FSS x SSC dot plot to orient the lymphocyte gate. On lymphocyte gate, CD4 x CD8 dot plots were evaluated. Cells from non-depleted naïve mice were stained or incubated with isotype antibodies and were used as positive and negative control samples.

Supplementary Figure 2 | Peptide screening by evaluation of IFN- γ production in splenocytes isolated from pE1D2-immunized BALB/c mice, challenged or not with DENV2. Positive E-derived peptide pools, previously evaluated by ELISPOT assay, were selected for individual peptide screening. Screening of peptides contained in pools 2, 4 and 5 (A), and in pools 7, 8, 9 and 10 (B). Splenocytes were isolated from BALB/c mice 15 days following the DNA inoculation (gray and light green bars) or 21 days post-infection (dark green bars), stimulated with E-derived peptides for 18 h, and the number of cells producing IFN- γ was measured by ELISPOT assay. Cells from naïve or pCTPA-inoculated mice were used as negative control. The horizontal dotted lines represent the cut-off selection point (≥ 5 SFC/5 $\times 10^5$ cells). Bars represent the mean plus standard deviation of triplicate data.

Supplementary Figure 3 | Peptide screening by evaluation of IFN- γ production in splenocytes isolated from pCTPANS1-immunized BALB/c mice, challenged or not with DENV2. Positive NS1-derived peptide pools, previously evaluated by ELISPOT assay, were selected for individual peptide screening. Screening of peptides contained in pools 2, 4, 5 and 6 (A), and in pools 7, 8 and 9 (B). Splenocytes were isolated from BALB/c mice 15 days after the DNA inoculation (gray and light blue bars) or 21 days post-infection (dark blue bars), stimulated with NS1-derived peptides for 18 h, and the number of cells producing IFN- γ was measured by ELISPOT assay. Cells from naïve or pCTPA-inoculated mice were used as negative control. The horizontal dotted lines represent the cut-off selection point (≥ 5 SFC/5 $\times 10^5$ cells). Bars represent the mean plus standard deviation of triplicate data.

Supplementary Figure 4 | IFN- γ ICS flow cytometry analysis to evaluate CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations from pE1D2 and pCTPANS1-immunized mice, challenged or not with DENV2. Splenocytes previously stimulated with E or NS1-derived peptides were stained with anti-CD3 PE, anti-CD4 APC, and anti-CD8 PerCP followed by intracellular staining with anti-IFN- γ Alexa Fluor 488. We backgated the CD3⁺ population on an FSS x SSC dot plot to construct the lymphocyte gate. The IFN- γ -producing CD4⁺ or CD8⁺ T cells were analyzed on CD4⁺CD3⁺ gate. Staining example of CD4⁺ or CD8⁺ T cells for IFN- γ from a pE1D2-immunized mouse.

Supplementary Figure 5 | TNF- α ICS flow cytometry analysis to evaluate CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations from pE1D2 and pCTPANS1-immunized mice, challenged or not with DENV2. Splenocytes previously stimulated with E or NS1-derived peptides were stained with anti-CD3 PE, anti-CD4 PerCP, and anti-CD8 FITC followed by intracellular staining with anti-TNF- α Alexa Fluor 647. We backgated the CD3⁺ population on an FSS x SSC dot plot to construct the lymphocyte gate. The TNF- α -producing CD4⁺ or CD8⁺ T cells were analyzed on CD4⁺CD3⁺ gate. Staining example of CD4⁺ or CD8⁺ T cells for TNF- α from a pE1D2-immunized and challenged mouse.

REFERENCES

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. (2013) 496:504–7. doi: 10.1038/nature12060
- WHO/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis*. (2009) 147:1. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1
- Malavige G, Ogg G. Pathogenesis of severe dengue infection. *Ceylon Med J*. (2012) 57:97. doi: 10.4038/cmj.v57i3.4701
- Liu Y, Liu J, Cheng G. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerg Microbes Infect*. (2016) 5:e77. doi: 10.1038/emi.2016.74
- Alves AMB, del Angel RM. Chapter 8 dengue virus and other flaviviruses (Zika): biology, pathogenesis, epidemiology, and vaccine development. In: Ludert JE, Pujol FH, Arbiza J, editors. *Human Virology in Latin America*. Cham: Springer International Publishing (2017). p. 141–67. doi: 10.1007/978-3-319-54567-7
- Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Hum Vaccines Immunother*. (2017) 13:1059–72. doi: 10.1080/21645515.2016.1261770
- Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. (2011) 29:7229–41. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.094
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabha S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. (2012) 380:1559–67. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61428-7
- Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*. (2015) 372:113–23. doi: 10.1056/NEJMoa1411037
- Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayanusonndh T, Dietze R, et al. Efficacy and long-term safety of

- a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med.* (2015) 373:1195–206. doi: 10.1056/NEJMoa1506223
11. Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine.* (2017) 35:6355–8. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.09.089
 12. Dans AL, Dans LF, Lansang MAD, Silvestre MAA, Guyatt GH. Controversy and debate on dengue vaccine series—paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. *J Clin Epidemiol.* (2018) 95:137–9. doi: 10.1016/j.jclinepi.2017.11.019
 13. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Pallardy S, Noriega F, Bouckennooghe, A. Letter of response to the article by Dans et al entitled “Review of a licensed dengue vaccine: Inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs.” *J Clin Epidemiol.* (2018) 95:140–1. doi: 10.1016/j.jclinepi.2017.12.024
 14. Mangada MM, Rothman AL. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol.* (2005) 175:2676–83. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2676
 15. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci.* (2010) 107:16922–7. doi: 10.1073/pnas.1010867107
 16. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci.* (2013) 110:E2046–53. doi: 10.1073/pnas.1305227110
 17. Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. The human CD8+ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *J Virol.* (2015) 89:120–8. doi: 10.1128/JVI.02129-14
 18. Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, Kolla RV, de Silva AD, de Silva AM, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci.* (2015) 112:E4256–63. doi: 10.1073/pnas.1505956112
 19. Elong Ngono A, Chen H-W, Tang WW, Joo Y, King K, Weiskopf D, et al. Protective role of cross-reactive CD8 T cells against dengue virus infection. *EBioMedicine.* (2016) 13:284–93. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.006
 20. Rivino L, Lim MQ. CD4+ and CD8+T-cell immunity to Dengue – lessons for the study of Zika virus. *Immunology.* (2017) 150:146–54. doi: 10.1111/imm.12681
 21. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Mol Biol.* (2003) 10:907–12. doi: 10.1038/nsb990
 22. Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res.* (2003) 59:141–75. doi: 10.1016/S0065-3527(03)59005-4
 23. Wahala WMPB, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology.* (2009) 392:103–13. doi: 10.1016/j.virol.2009.06.037
 24. Gallichotte EN, Widman DG, Yount BL, Wahala WM, Durbin A, Whitehead S, et al. A new quaternary structure epitope on dengue virus serotype 2 is the target of durable type-specific neutralizing antibodies. *MBio.* (2015) 6:15. doi: 10.1128/mBio.01461-15
 25. Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, et al. CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol.* (2010) 185:5405–16. doi: 10.4049/jimmunol.1001709
 26. Weiskopf D, Yauch LE, Angelo MA, John DV, Greenbaum JA, Sidney J, et al. Insights into HLA-restricted T cell responses in a novel mouse model of dengue virus infection point toward new implications for vaccine design. *J Immunol.* (2011) 187:4268–79. doi: 10.4049/jimmunol.1101970
 27. Rivino L, Kumaran EAP, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, et al. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *J Virol.* (2013) 87:2693–706. doi: 10.1128/JVI.02675-12
 28. Chen H-W, Hu H-M, Wu S-H, Chiang C-Y, Hsiao Y-J, Wu C-K, et al. The immunodominance change and protection of CD4+ T-cell responses elicited by an envelope protein domain III-based tetravalent dengue vaccine in mice. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0145717. doi: 10.1371/journal.pone.0145717
 29. Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, Kim K, et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+T cells. *Nat Microbiol.* (2017) 2:36. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.36
 30. Weiskopf D, Angelo MA, Sidney J, Peters B, Shresta S, Sette A. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection. *J Virol.* (2014) 88:11383–94. doi: 10.1128/JVI.01108-14
 31. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* (1987) 68:853–7. doi: 10.1099/0022-1317-68-3-853
 32. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol.* (1988) 69:2101–7. doi: 10.1099/0022-1317-69-8-2101
 33. Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JLS, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine.* (2006) 24:195–205. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.07.059
 34. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FAMO, Rodrigues JF, Bizerra RSP, Gonçalves AJS, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine.* (2012) 30:837–45. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.034
 35. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol.* (1999) 73:6104–10. doi: 10.7554/eLife.15039
 36. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* (2013) 98:192–208. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008
 37. Akey ADL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J. Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science.* (2014) 343:1–31. doi: 10.1126/science.1247749.Flavivirus
 38. Glasner DR, Puerta-Guardo H, Beatty PR, Harris E. The good, the bad, and the shocking: the multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annu Rev Virol.* (2018) 5:227–53. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041848
 39. Gonçalves AJS, Oliveira ERA, Costa SM, Paes MV, Silva JFA, Azevedo AS, et al. Cooperation between CD4+ T cells and humoral immunity is critical for protection against dengue using a DNA vaccine based on the NS1 antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* (2015) 9:1–22. doi: 10.1371/journal.pntd.0004277
 40. Azevedo AS, Yamamura AMY, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS ONE.* (2011) 6:e20528. doi: 10.1371/journal.pone.0020528
 41. Azevedo AS, Gonçalves AJS, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AMB. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS ONE.* (2013) 8:e58357. doi: 10.1371/journal.pone.0058357
 42. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AMB. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology.* (2007) 358:413–23. doi: 10.1016/j.virol.2006.08.052
 43. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med.* (1984) 184:159–69. doi: 10.1007/BF01852390
 44. Oliveira ERA, Gonçalves AJS, Costa SM, Azevedo AS, Mantuano-Barradas M, Nogueira ACMA, et al. Aspects of T cell-mediated immunity induced in mice by a DNA vaccine based on the dengue-ns1 antigen after

- challenge by the intracerebral route. *PLoS ONE*. (2016) 11:e163240. doi: 10.1371/journal.pone.0163240
45. Rivino L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. *Expert Rev Vaccines*. (2016) 15:443–53. doi: 10.1586/14760584.2016.1116948
 46. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol*. (2018) 19:1189–98. doi: 10.1038/s41590-018-0210-3
 47. Weiskopf D, Cerpas C, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, et al. The human CD8+ T-cell responses against the 4 dengue virus serotypes are associated with distinct patterns of protein targets. *J Infect Dis*. (2015) 212:1743–51. doi: 10.1093/infdis/jiv289
 48. Tian Y, Sette A, Weiskopf D. Cytotoxic CD4 T cells: differentiation, function, and application to dengue virus infection. *Front Immunol*. (2016) 7:531. doi: 10.3389/fimmu.2016.00531
 49. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert, et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides—what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol*. (2004) 65:523–36. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.017
 50. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. (2004) 78:2701–10. doi: 10.1128/JVI.78.6.2701-2710.2004
 51. Hatch S, Endy TP, Thomas S, Mathew A, Potts J, Pazoles P, et al. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. *J Infect Dis*. (2011) 203:1282–91. doi: 10.1093/infdis/jir012
 52. Rothman AL, Kurane I, Ennis FA. Multiple specificities in the murine CD4+ and CD8+ T-cell response to dengue virus. *J Virol*. (1996) 70:6540–6.
 53. Li S, Peng L, Zhao W, Zhong H, Zhang F, Yan Z, et al. Synthetic peptides containing B- and T-cell epitope of dengue virus-2 E domain III provoked B- and T-cell responses. *Vaccine*. (2011) 29:3695–702. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.03.002
 54. Duan ZL, Liu HF, Huang X, Wang SN, Yang JL, Chen XY, et al. Identification of conserved and HLA-A*2402-restricted epitopes in Dengue virus serotype 2. *Virus Res*. (2015) 196:5–12. doi: 10.1016/j.virusres.2014.10.022
 55. Weiskopf D, Alwis R, Paul S, Angelo MA, Sidney J, Sette A, et al. *Identification of CD8+ T Cell Epitopes in DENV Using Samples From a Nicaragua Cohort*. IEDB ID1027503 (2014). Available online at: http://www.iedb.org/reference/1027503?cookie_id=acf322
 56. Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, et al. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther*. (2008) 19:927–36. doi: 10.1089/hum.2008.011
 57. Nascimento EJM, Mailliard RB, Khan AM, Sidney J, Sette A, Guzman N, et al. Identification of conserved and HLA promiscuous DENV3 T-cell epitopes. *PLoS Negl Trop Dis*. (2013) 7:2497. doi: 10.1371/journal.pntd.0002497
 58. Braga ELA, Moura P, Pinto LMO, Ignácio SRN, Oliveira MJC, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor- α , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- γ in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2001) 96:229–32. doi: 10.1590/S0074-02762001000200015
 59. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis*. (2002) 185:1697–703. doi: 10.1086/340822
 60. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. (2007) 85:43–5. doi: 10.1038/sj.icb.7100008
 61. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol*. (2017) 39:563–74. doi: 10.1007/s00281-017-0625-1
 62. Kuczera D, Assolini JP, Tomiotto-Pellissier F, Pavanelli WR, Silveira GF. Highlights for dengue immunopathogenesis: antibody-dependent enhancement, cytokine storm, and beyond. *J Interf Cytokine Res*. (2018) 38:69–80. doi: 10.1089/jir.2017.0037
 63. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor α and transforming growth factor β in French Polynesia growth factor p-1 in. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. (1998) 92:654–6.
 64. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1 β and IFN- γ as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. (2008) 8:86. doi: 10.1186/1471-2334-8-86
 65. Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS ONE*. (2012) 7:e50387. doi: 10.1371/journal.pone.0050387
 66. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. (2009) 183:7919–30. doi: 10.4049/jimmunol.0803903
 67. Grifoni A, Costa-Ramos P, Pham J, Tian Y, Rosales SL, Seumois G, et al. Cutting edge: transcriptional profiling reveals multifunctional and cytotoxic antiviral responses of Zika virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol*. (2018) 201:3487–91. doi: 10.4049/jimmunol.1801090

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Pinto, Assis, Vallochi, Pacheco, Lima, Quaresma, Pereira, Costa and Alves. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.