

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**DESENHO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
POTENCIALMENTE APLICÁVEIS NO DESENVOLVIMENTO DE
TESTES DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS PARA A FEBRE
DENGUE**

por

Izabella Cristina Andrade Batista

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR I.C.A. BATISTA 2016

IZABELLA CRISTINA ANDRADE BATISTA

**DESENHO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
POTENCIALMENTE APLICÁVEIS NO DESENVOLVIMENTO DE
TESTES DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS PARA A FEBRE
DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva
Coorientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira e Dra. Jacqueline Araújo Fiuza

Belo Horizonte

2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

B333d Batista, Izabella Cristina Andrade.
2016

Desenho e produção de proteínas quiméricas potencialmente aplicáveis no desenvolvimento de testes diagnóstico e/ou vacinas para a febre Dengue / Izabella Cristina Andrade Batista. – Belo Horizonte, 2016.

XVI, 119 f. il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 119 - 133

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/transmissão 2. Vírus da Dengue/imunologia 3. Vacinas/uso terapêutico. I. Título. II. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (Orientação). III. Oliveira, Jaqueline Germano de (Co-orientação). IV. Fiuza, Jacqueline Araújo (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

IZABELLA CRISTINA ANDRADE BATISTA

**DESENHO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
POTENCIALMENTE APLICÁVEIS NO DESENVOLVIMENTO DE
TESTES DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS PARA A FEBRE
DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (Centro de Pesquisas René Rachou)
Presidente
Prof. Dr. Edward José de Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou) Titular
Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais)
Titular
Prof. Dr. Flora Satiko Kano (Centro de Pesquisas René Rachou) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/02/2016.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara, por me orientar, por todos os ensinamentos, conselhos, pela paciência e confiança. Sinto-me privilegiada de ter sido orientada por alguém como você que além de ter sido um grande professor para mim, foi psicólogo nas horas do desespero e amigo nos momentos de descontração. Hoje, vejo o tanto que cresci desde a minha iniciação científica e não tenho dúvidas de que você foi muito importante para que isso acontecesse.

Agradeço às minhas coorientadoras Jaqueline Germano e Jacqueline Fiuza. Jaque Germano, muito obrigada por todos os ensinamentos, por toda disponibilidade e boa vontade de sempre me ajudar! Você é uma verdadeira mãezona! Jacque Fiuza, como aprendi com você nestes últimos 4 meses... Foi praticamente um intensivo de imunologia e tenho certeza que não teria uma pessoa melhor para me ensinar! Muito obrigada por tudo! Não sei o que seria do meu mestrado sem você.

Ao Dr. Rodrigo Correa, por ter me dado a oportunidade de realizar minha iniciação científica no LICM e isso me fez descobrir minha verdadeira paixão pela Ciência.

Às pesquisadoras Soraya Gaze e Érica Alves por sempre estarem dispostas a me ajudar, seja para treinar o inglês, esclarecer dúvidas ou para eutanasiar 40 camundongos de uma vez. Muito obrigada pela disponibilidade de vocês e por tudo que têm feito por mim!

À Dr. Bárbara Quinan que é um exemplo de pessoa e de profissional. Muito obrigada por tudo que aprendi com você e por tudo que você fez para que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante esta caminhada. Anna, Jorge, Stella, Eneida, Roberta, Emerson, Rafael, Vitor, Luiza, Carol, Yasmim, Nayara, Talita, Juliana, Teresiana, Paty, Dani, Cassinha, Robertinha, Fernanda, Renata, Aninha, Camila, Marina, muito obrigada pela amizade, pelas conversas nas sextas-feiras depois das 17h, pelo apoio, carinho e colaboração. Essa caminhada ficou mais prazerosa com vocês ao meu lado.

À Luciana Lisboa, Ricardo e Vinícius por toda boa vontade e por serem tão prestativos. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

À Clari, que é amiga, mãe, psicóloga, conselheira e além de tudo tem a capacidade de solucionar todos os problemas que temos independente da origem dele. Muito obrigada por ter tornado meus dias, até mesmo as segundas-feiras, mais felizes.

À Dra. Caroline Junqueira pelos ensinamentos, colaboração e ajuda.

À Dra. Cristina Toscano e suas alunas Paty, Gardenia e Clarice. Muito obrigada pelos materiais "emprestados" e pela ajuda no biotério.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde CPqRR por todo aprendizado que adquiri e por todo auxílio.

À plataforma de Sequenciamento e de Citometria de fluxo PDTIS-CPqRR.

Ao Dr. Paulo Peregrino, Dra Erna Kroon, Dra. Karla e Dra. Leandra pelo auxílio em importantes etapas deste projeto.

Ao Laboratório de Vírus e de Virologia Básica e Aplicada da UFMG pela ajuda, colaboração e disponibilização de materiais e equipamentos. Muito obrigada por tudo Paulinha e Alice!

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ, sem as quais nada disso seria possível.

Em especial...

Agradeço aos meus pais por serem meu maior exemplo de vida. Abriram mão de tantas coisas para que eu pudesse seguir os meus sonhos... Muito obrigada pelo amor, incentivo, por me ensinarem a ter perseverança e por me fazerem ter orgulho da profissão que escolhi mesmo nos momentos mais difíceis. Sem o apoio de vocês não chegaria aonde cheguei!

À minha irmã Bruna e melhor amiga pelo carinho, companheirismo, cumplicidade e por estar sempre do meu lado quando eu precisei.

Ao meu namorado Breno, que sempre me apoiou incondicionalmente e me ajudou a ser firme quando minha única vontade era desistir. Obrigada por muitas vezes ter aberto mão da minha companhia sem questionar o motivo, por me aturar nos momentos de estresse, ansiedade e nervosismo. Obrigada pelo amor, companheirismo e principalmente, pela paciência. Tudo fica mais fácil com você ao meu lado.

À toda minha família e amigos por terem acreditado em mim e pela torcida.

RESUMO

A dengue é uma doença viral transmitida de mosquitos para humanos sendo a arbovirose mais prevalente em países tropicais e subtropicais, atingindo milhões de pessoas em diferentes regiões do mundo. A dengue é causada pelo Dengue virus (DENV), membro da família Flaviviridae, que possuem 4 sorotipos geneticamente distintos conhecidos como DENV 1-4. Uma vacina eficiente necessita de gerar resposta imune tetravalente balanceada. Para alcançarmos essa imunidade tetravalente balanceada, trabalhamos com a hipótese de que proteínas quiméricas expressando epítomos imunogênicos dos quatro sorotipos do DENV possam ser utilizadas no desenvolvimento de uma vacina segura e/ou um sistema de diagnóstico eficiente. Para este estudo onze proteínas quiméricas foram desenhadas contendo regiões de proteínas com potencial imunogênico derivado do envelope, capsídeo, membrana e/ou da proteína não estrutural NS1, dos quatro sorotipos do DENV. Tais regiões foram selecionadas *in silico* utilizando-se o algoritmo BepiPred. Regiões com alta homologia entre os quatro sorotipos do DENV foram preferencialmente incluídas, mas regiões antigênicas de um ou mais sorotipos do DENV também foram utilizados. As proteínas quiméricas foram construídas pela adição de resíduos de aminoácidos entre as sequências selecionadas, chamados de espaçadores, para que a estrutura dos epítomos expressos fosse mantida. A sequência final de aminoácidos foi traduzida e a sequência de nucleotídeos foi otimizada utilizando o algoritmo LETO 1.0 (Entelechon). Todas as onze proteínas quiméricas foram produzidas utilizando os vetores de expressão pET 28 TEV, pQE-9 ou pET-21a, transformados em *E. coli* BL21 ou M15 e foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel para realização de ensaios de Western blot e ELISA para testar a reatividade das proteínas com soros de indivíduos já infectados pelo DENV e indivíduos nunca infectados e testes de imunogenicidade através da imunização de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6. Nossos resultados mostraram um reconhecimento específico de cinco proteínas quiméricas com soros de pacientes sabidamente infectados pelo DENV-1, DENV-2 ou DENV-3. Além disso, a imunização de camundongos com a proteína quimérica EnvEpII, mostrou que esta proteína foi capaz de estimular uma produção robusta de anticorpos IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2c} nas duas linhagens de camundongos testadas e de anticorpos neutralizantes em C57BL/6. Além disso, foi observada a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em BALB/c e o aumento dos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-17 e IFN γ , quando camundongos foram imunizados com a proteína EnvEpII. Nossos resultados demonstram que desenhar, sintetizar, expressar e purificar proteínas quiméricas em sistemas bacterianos é viável e, dessa forma, proteínas artificiais podem ser estudadas como candidatas para o desenvolvimento de vacinas e/ou sistemas de diagnóstico contra doenças infecciosas.

Palavras-chave: Dengue virus, proteínas quiméricas, vacina, diagnóstico.

ABSTRACT

Dengue is the most common mosquito-borne viral disease of humans and the most prevalent arbovirus in tropical and subtropical countries, infecting thousands individuals annually in different regions of the world. Dengue is caused by Dengue virus (DENV), members of the Flaviviridae family and is composed by 4 genetically distinct serotypes referred to as DENV 1–4. A safe vaccine demands a balanced tetravalent immune response. To address the balanced immune response, we hypothesized that chimeric proteins with potential immunogenic epitopes from the four DENV serotypes can be used to develop a safe dengue vaccine and/or an efficient diagnostic system. We designed eleven chimeras, for this the most potentially immunogenic regions of proteins derived from envelope, capsid, membrane and/or non-structural protein 1, NS1, from all DENV serotypes were *in silico* selected using the BepiPred algorithm. High homology regions among the four DENV serotypes were preferentially included, but antigenic regions from single or pairs of DENV serotypes were also used. The chimeras were constructed by adding non immunogenic amino acid residues between the selected sequences, named spacers residues, thus the expressed epitopes structure was maintained. The final chimeric amino acid sequence was back translated and the nucleotide sequence was optimized using the LETO 1.0 algorithm (Entelechon). All the eleven chimeric proteins were produced using the expression vectors pET 28 TEV, pQE-9 and pET-21a, transformed in *E. coli* BL21 or M15, and purified by Nickel-affinity chromatography to perform the Western blot and ELISA assays to test their reactivity with sera of DENV-infected patients and DENV-negative sera and to test their immunogenicity through the immunization of mice strains BALB/c and C57BL/6. Our results showed a specific recognition of five proteins by sera DENV-1, DENV-2 or DENV-3 infected patients. Moreover, the immunization using the chimera EnvEpII, shows that this protein are able to stimulate a robust production of antibodies IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2c} in both mice strains tested and neutralizing antibodies were produced in C57BL/6. We also noted the activation of T cells CD4⁺ and CD8⁺ in BALB/c and the production of IL-2, IL-4, IL-17 and IFN γ when we immunized the mice with EnvEpII. Our results indicating that design, synthesize, express and purify artificial proteins in bacterial systems is viable and, thus, these proteins can be studied as candidates for the development of vaccines and/or diagnostic systems against infectious diseases.

Key-words: Dengue virus, chimerical proteins, vaccine, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da partícula viral e organização do genoma dos membros do gênero Flavivirus.	18
Figura 2: Esquema do ciclo de multiplicação do DENV no interior da célula hospedeira humana.....	24
Figura 3: Classificação dos casos de dengue adotada atualmente pela Organização Mundial da Saúde.....	27
Figura 4: Estrutura esquemática da proteína qDV.	41
Figura 5: Representação esquemática da construção das proteínas quiméricas.....	44
Figura 6: Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados nos experimentos de clonagem.....	49
Figura 7: Esquema da imunização com a proteína EnvEplI em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 para avaliação da resposta humoral e celular.	59
Figura 8: Representação esquemática da análise de citocinas presentes no soro de camundongos, através do ensaio de CBA.	66
Figura 9: Clonagem do minigene qDV nos plasmídios pET 28 TEV e pQE-9.....	69
Figura 10: Confirmação da presença dos insertos (minigenes) que codificam para proteínas quiméricas contendo epítopos para NS1.....	70
Figura 11: Confirmação da presença de inserto que codificam para proteínas quiméricas que contém epítopos para E por PCR.	71
Figura 12: Verificação da expressão da proteína quimérica qDV.....	73
Figura 13: Verificação da expressão das proteínas quiméricas NS1EplI, NS1EplII, NS1EplIII, NS1EplIV, ChimNS1, EnvEplI, EnvEplII, EnvEplIII, EnvEplIV, ChimEnv.....	74
Figura 14: Gel representativo das 11 proteínas quiméricas purificadas por cromatografia de afinidade em resina de níquel.....	75
Figura 15: Ensaio de Western blot para análise da reatividade da proteína qDV com anticorpos presentes em soros de pacientes infectados e não infectados pelo DENV.	76
Figura 16: Ensaio de ELISA para análise da reatividade das proteínas NS1EplI, NS1EplIII, EnvEplII, EnvEplIII e qDV com anticorpos presentes em soros de indivíduos infectados e não infectados pelo DENV.....	78
Figura 17: Análise da reatividade das proteínas EnvEplII, EnvEplIII e qDV com soros de pacientes infectados pelo DENV 1, 2 e/ou 3 por ELISA.....	79
Figura 18: Avaliação da resposta humoral de camundongos BALB/c imunizados com a proteína EnvEplII.	81
Figura 19: Avaliação da resposta humoral de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEplII.	83
Figura 20: Efeito citopático do DENV-3 em células BHK-21 verificado em um ensaio de soroneutralização.....	84

Figura 21: Ensaio de soroneutralização para análise da presença de anticorpos neutralizantes anti-DENV-3 em pool de soros de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEpll associada ao Alúmem.....	85
Figura 22: Valor absoluto de células CD3 ⁺ (mm ³) após 6h, 16h e 24h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	87
Figura 23: Valor absoluto de células CD3 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	88
Figura 24: Valor absoluto de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	90
Figura 25: Valor absoluto de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	91
Figura 26: Valor absoluto de células CD3 ⁺ CD8 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	93
Figura 27: Valor absoluto de células CD3 ⁺ CD8 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	94
Figura 28: Valor absoluto de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ , CD8 ⁺ CD25 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	96
Figura 29: Valor absoluto de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ , CD8 ⁺ CD25 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	98
Figura 30: Valor absoluto de células CD4 ⁺ CD74 ⁺ , CD8 ⁺ CD74 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	100
Figura 31: Valor absoluto de células CD4 ⁺ CD74 ⁺ , CD8 ⁺ CD74 ⁺ (mm ³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpll.....	102
Figura 32: Análise de citocinas IL-10, IL17, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 do sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c após 24 h de estímulo com a proteína EnvEpll.....	104
Figura 33: Análise de citocinas IL-10, IL17, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 do sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos da linhagem C57BL/6 após 24 h de estímulo com a proteína EnvEpll.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas em desenvolvimento	36
Tabela 2: Proteínas quiméricas produzidas no estudo e seus respectivos números de aminoácidos e tamanhos.	45
Tabela 3: Iniciadores específicos utilizados na reação de PCR e sequenciamento para verificação da inserção correta dos minigenes nos vetores de expressão.	53
Tabela 4: Amostras utilizadas nos testes de reatividade das proteínas quiméricas com soros de indivíduos infectados e nunca infectados pelo DENV	56
Tabela 5: Anticorpos utilizados para imunofenotipagem celular	64
Tabela 6: Identificação das proteínas produzidas	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHK21 - Baby Hamster Kidney (células de rim de bebê de hamster)

CMC – Carboximetilcelulose

DENV - Dengue virus

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)

FD – Febre da dengue

FHD - Febre Hemorrágica do Dengue

IFN γ - interferon gama

Ig - imunoglobulina

IL - Interleucina

KDa - kilodalton

NS - não estrutural

Pb - pares de base

PBS - Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)

PFU - Plaque forming units (Unidades Formadoras de Placa)

PRNT - Plaque Reduction Neutralization Test (Teste de neutralização por redução de placas)

RE - retículo endoplasmático

RPM - rotações por minuto

SCD - Síndrome do Choque da Dengue

SFB - Soro Fetal Bovino

Th1 - resposta auxiliadora do tipo 1

Th2 - resposta auxiliadora do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

WHO – World health organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DENGUE VIRUS	17
1.1.1	ESTRUTURA VIRAL E GENOMA	17
1.1.2	PROTEÍNAS VIRAIS: CARACTERIZAÇÃO E IMUNOGENICIDADE	19
1.1.2.1	Proteínas estruturais	19
1.1.2.2	Proteínas não estruturais	20
1.1.3	MULTIPLICAÇÃO DO DENV	22
1.1.4	QUADRO CLÍNICO DE PACIENTES INFECTADOS PELO DENV	24
1.1.5	IMUNOPATOGENIA DA DENGUE	27
1.1.6	EPIDEMIOLOGIA	29
1.1.6.1	Dengue no Brasil	29
1.1.7	DIAGNÓSTICO	30
1.1.8	VACINAS CANDIDATAS	32
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	DESENHO DOS MINIGENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	40
4.1.1	PROTEÍNA QDV	40
4.1.2	OUTRAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS UTILIZADAS NO ESTUDO	42
4.2	PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	45
4.2.1	PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS E. COLI DH5A, M15 E BL21 COMPETENTES	45
4.2.2	PREPARAÇÃO DOS MINIGENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS (INSERTOS)	46
4.2.2.1	Amplificação do plasmídeo pUC57 clonado com cada um dos minigenes	46
4.2.2.2	Extração plasmídeo pUC57 clonado com cada um dos minigenes por meio de lise alcalina (Miniprep)	47
4.2.2.3	Restrição enzimática para digestão dos minigenes	47
4.2.2.4	Eletroforese em gel de agarose	47
4.2.2.5	Purificação dos insertos utilizando gel de agarose	48
4.2.3	PREPARAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO	48
4.2.3.1	Amplificação dos vetores de expressão pET-21, pET 28 TEV e pQE-9	48
4.2.3.2	Extração dos vetores plasmidiais de expressão por lise alcalina (Miniprep)	50
4.2.3.3	Restrição enzimática dos vetores de expressão	50
4.2.3.4	Purificação dos vetores de expressão digeridos	50

4.2.4	LIGAÇÃO DOS INSERTOS EM VETORES DE EXPRESSÃO	50
4.2.5	AMPLIFICAÇÃO DAS LIGAÇÕES UTILIZANDO BACTÉRIAS COMPETENTES	51
4.2.6	DIGESTÃO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO	51
4.2.7	PCR DE COLÔNIA DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE INSERTO	52
4.2.8	SEQUENCIAMENTO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS	52
4.2.9	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR INDUÇÃO COM IPTG	53
4.2.10	ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA A 10% PARA A VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERESSE	54
4.2.11	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	54
4.2.12	DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR BCA	55
4.3	TESTES DE REATIVIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM SOROS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS E NUNCA INFECTADOS POR DENV	55
4.3.1	AMOSTRAS UTILIZADAS	55
4.3.2	WESTERN BLOT	56
4.3.3	ELISA	57
4.4	AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA ENVÉPII	58
4.4.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	58
4.4.2	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO A PROTEÍNA ENVÉPII	58
4.4.2.1	Avaliação da resposta humoral	60
4.4.2.1.1	ELISA	60
4.4.2.1.2	Soroneutralização	60
4.4.2.1.2.1	Células BHK21	60
4.4.2.1.2.2	Dengue virus	61
4.4.2.1.2.3	Ensaio PRNT ₅₀	61
4.4.2.2	Avaliação da resposta celular	62
4.4.2.2.1	Cultura de esplenócitos	62
4.4.2.2.2	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	63
4.4.2.2.3	Avaliação do padrão de citocinas nos sobrenadantes de cultura por citometria de fluxo	64
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66

5 RESULTADOS **67**

5.1	OBTENÇÃO DOS CLONES PRODUTORES DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS UTILIZADAS NO ESTUDO	67
5.2	PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	72
5.3	TESTES DE REATIVIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM SOROS DE PACIENTES INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR DENV	76
5.3.1	WESTERN BLOT	76
5.3.2	ELISA	77
5.4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6 IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA ENVÉPII	80
5.4.1	ELISA	80

5.4.2	ENSAIO DE SORONEUTRALIZAÇÃO	84
5.5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DE CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6 IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA ENVEPII	86
5.6	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CITOCINAS	103
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	117
8	PERSPECTIVAS	118
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXOS	134

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue virus

O Dengue virus (DENV) é o agente etiológico da dengue, responsável por causar um alto impacto na saúde pública do Brasil e de outros países tropicais e subtropicais, em função de sua ampla distribuição e de sua capacidade em causar significativa morbidade e mortalidade em humanos (Gubler, 2011).

O DENV pertence ao maior gênero da família Flaviviridae, o Flavivírus, representado por aproximadamente 70 tipos virais, dentre eles o vírus da febre amarela (Yellow fever virus – YFV), o Zika vírus (ZIKV), o vírus da encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus - JEV), o vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus - WNV), o vírus da encefalite veiculada por carrapato (Tick-borne encephalitis virus - TBEV) [Gubler, 2007; Choumet & Desprès, 2015]. O DENV possui quatro sorotipos distintos (DENV-1, -2, -3 e -4) e é transmitido ao homem através da picada de insetos dípteros, entre os quais o *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor. Uma infecção com um sorotipo de DENV resulta em proteção por toda vida contra reinfecções causadas pelo mesmo sorotipo, mas somente uma proteção breve contra reinfecções heterólogas (Burke & Monath, 2001; Holmes & Twiddy, 2003; Rico-Hesse, 2003).

1.1.1 Estrutura viral e genoma

A partícula viral do DENV, assim como dos demais membros da família Flaviviridae, apresenta forma esférica, envelopada, contém um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica denso envolvido por uma bicamada lipídica e possui diâmetro de 40 a 50 nm (Figura 1) [Henchal & Putnak, 1990; Kuhn et al, 2002].

Seus genes são organizados em molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva, cujo genoma é composto de 10.862 nucleotídeos (3400 aminoácidos) flanqueados pela estrutura 5' cap do tipo I ($m^7GpppAmpN_2$) e uma extremidade 3' terminal não-poliadenilada (Kuhn et al, 2002). A tradução do RNA genômico origina uma longa poliproteína que sofre sucessivas clivagens por proteases do hospedeiro vertebrado e do próprio vírus. Tais clivagens originam as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus (Markoff

et al, 1997; Lindenbach et al, 2013). A organização das proteínas do DENV na poliproteína é: C-prM/M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, onde C (capsídeo), prM/M (membrana) e E (envelope) representam as proteínas estruturais ou seus precursores, enquanto as proteínas NS (NS1-NS5) representam as proteínas não estruturais (Lindenbach et al, 2013).

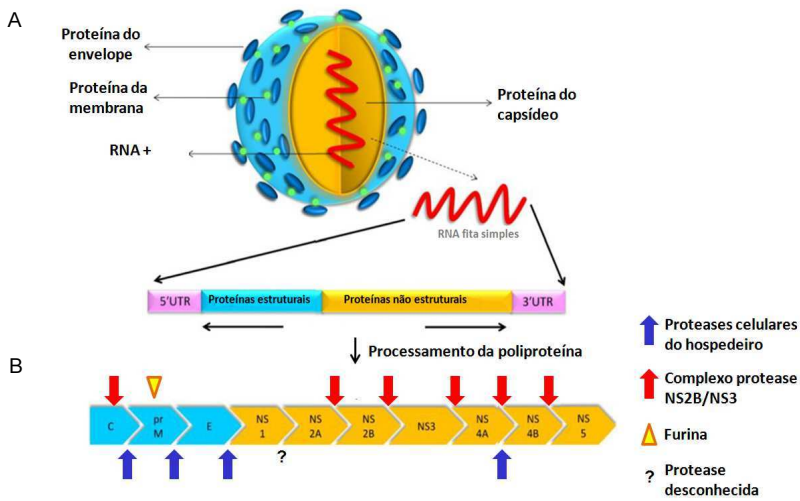


Figura 1: Esquema da partícula viral e organização do genoma dos membros do gênero Flavivirus.

A: O RNA viral encontra-se envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto pela proteína C. O nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica que contém as proteínas M e E. B: Clivagem da poliproteína viral por proteases virais (setas vermelhas), celulares (setas azuis) e pela furina (triângulo). A protease que realiza a clivagem de NS1/NS2A ainda não é conhecida. Fonte: adaptado Melino & Paci, 2007; Ashraf et al, 2015;

1.1.2 Proteínas virais: caracterização e imunogenicidade

1.1.2.1 Proteínas estruturais

A proteína C do vírus, a primeira a ser sintetizada no ciclo de multiplicação viral, é uma proteína pequena (~11 kDa), altamente básica, que forma o nucleocapsídeo da partícula viral dos Flavivirus (Melino & Paci, 2007; Lindenbach et al, 2007). A proteína C imatura contém uma cauda C-terminal hidrofóbica que serve como peptídeo sinal para translocação da prM para o retículo endoplasmático da célula. Esta interação é clivada em duas etapas, a primeira pela protease viral NS2B-3 e, posteriormente, pela peptidase sinal. A proteína C madura é montada em um dímero compacto, sendo que cada monômero possui 4 α -hélices (Ma et al, 2004; Lindenbach et al., 2007). A porção central da proteína C contém domínio hidrofóbico que interage com membranas celulares, o que lhe atribui um papel na montagem viral (Westaway, 1987).

A proteína C também possui potencial imunogênico. Já foi visto que estas proteínas são alvo de células T (Gagnon et al., 1996) e foi comprovado que dois de seus epítomos possuem uma capacidade protetora em testes realizados com camundongos (Yauch et al., 2010). É importante salientar que vários trabalhos relacionam a imunogenicidade da proteína C com o domínio III da proteína E, ou seja, fortes evidências indicam que as duas proteínas agem em conjunto para gerar uma resposta imune protetora (Valdés et al, 2009; Suzarte et al, 2015; Zuest et al, 2015).

A proteína prM é um precursor glicosilado (26 KDa) da proteína estrutural M (8 KDa). PrM sofre uma clivagem tardia dando origem à proteína M e ao fragmento N-terminal pr, que é secretado no meio extracelular. A proteína M está relacionada com a maturação da proteína C e acredita-se que sua função esteja relacionada à estabilização da proteína E durante os primeiros eventos de montagem do vírus (Burke & Monath, 2001).

Um estudo mostrou que a interação da proteína prM/M com outras proteínas virais são de extrema importância para indução da resposta imune do hospedeiro (Rodenhuis-Zybert et al, 2015). A proteína da prM apresenta grande importância para expressão e processamento da proteína E e a

proteína NS1 tem capacidade de induzir uma forte resposta humoral (Lin et al., 1998). Isto pode ser comprovado a partir de alguns estudos. Um deles, feito por Zheng e colaboradores (2011), mostrou que em camundongos inoculados com um plasmídeo para a expressão das proteínas prM/M-E-NS1 foi verificada uma alta eficiência de produção de anticorpos contra tais proteínas. Considerando-se ainda que a superfície viral é composta principalmente pelas proteínas M e E entrelaçadas, estes antígenos são capazes de induzir produção de anticorpos neutralizantes (Mason, 1989; Burke & Monath, 2001).

A glicoproteína E (50 KDa) é o maior e mais importante antígeno da superfície viral, sendo considerada uma das peças-chaves no processo de infecção viral, visto que ela é capaz de se ligar a receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira, sendo responsável pela penetração do vírus, além de apresentar atividade hemaglutinante e de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Lindenbach et al., 2007). Mutações na proteína E podem comprometer a patogênese viral (Mayhob, 2011). Essa proteína é sintetizada como uma proteína de membrana tipo I contendo 12 resíduos conservados de cisteína. A dimerização adequada, a estabilidade em baixo pH e sua secreção dependem da sua co-expressão com a proteína prM (Lindenbach et al., 2007).

A proteína E forma homodímeros, sendo que cada monômero é constituído de três domínios distintos, denominados: domínio I, que constitui a região central N terminal; domínio II, o qual compreende uma região de dimerização da proteína E por contato de moléculas adjacentes ao longo da superfície viral e contém o peptídeo de fusão; e o domínio III na porção C terminal, semelhante às imunoglobulinas, está envolvido na ligação ao receptor e é o maior alvo de anticorpos neutralizantes. Sugere-se que este domínio contém resíduos responsáveis pelo tropismo e virulência nos Flavivírus (Whitehead et al., 2007; Pierson & Diamond, 2008; Gromowski et al, 2008).

1.1.2.2 Proteínas não estruturais

A proteína NS1 é uma glicoproteína de peso molecular em torno de 48 kDa e está localizada no interior do retículo endoplasmático, mas também pode ser encontrada associada à membrana celular e secretada no meio extracelular

(forma solúvel). A forma solúvel de NS1 é produzida em altas quantidades nas primeiras 48 horas pós-infecção. A co-localização de NS1 com RNA dupla fita nas células infectadas, e outras evidências, sugere que esta proteína esteja envolvida na replicação do RNA de DENV (Chambers et al., 1990; Lindenbach et al., 2007). A proteína NS1 também é um importante alvo de anticorpos produzidos pelo hospedeiro humano durante uma infecção causada pelo DENV, sendo considerada uma forte candidata ao desenvolvimento de vacinas contra a dengue. A NS1 pode ativar o sistema do complemento e, além disso, estudos feitos, utilizando esta proteína, demonstraram que vacinas de DNA, imunização ativa ou passiva, utilizando anticorpos anti NS1, promoveram uma proteção em camundongos desafiados com o DENV (Schlesinger et al, 1987; Henchal et al, 1998; Wu et al. 2003; Costa et al. 2007; Amorim et al., 2012). Um estudo recente mostrou também a capacidade da proteína NS1 de ativar os receptores do tipo toll 2 e 6 (Chen et al., 2015).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas e pouco conservadas. A proteína NS2A é relativamente pequena (~22 KDa), transmembranar e hidrofóbica, com um importante papel no processamento da NS1. A porção N-terminal de NS2A é gerada por uma enzima ainda desconhecida residente do retículo endoplasmático da célula hospedeira, enquanto a porção C-terminal é gerada pela clivagem de NS2B-3 no citoplasma. A NS2B é uma proteína de peso molecular de 14 KDa e está associada à membrana. Pode se associar a proteína NS3 e exercer uma atividade proteolítica na biossíntese viral. A NS4A (~16 KDa) promove a interação do complexo NS5-NS3-NS2A-RNA com a proteína NS1, que se encontra no lúmen do retículo endoplasmático, além de ser uma subunidade do complexo de replicação. A proteína NS4B (24 KDa) pode ser encontrada dispersa na membrana citoplasmática e sua função ainda é desconhecida (Clyde et al., 2006; Lindenbach et al., 2007; Melino & Paci, 2007; Qi et al., 2008).

A proteína NS3, com peso molecular em torno de 70 KDa, é altamente conservada entre os Flavivirus, sendo relacionada a funções enzimáticas na replicação e no processamento da poliproteína. A porção N-terminal da proteína NS3 possui atividade de serina protease na clivagem pós-traducional da poliproteína viral, enquanto a porção C-terminal possui atividade de

nucleotídeo trifosfatase (NTPase), RNA trifosfatase (RTPase) e de helicase (Chambers et al., 1990). Estas funções da porção C-terminal ainda não estão completamente elucidadas (Lindenbach & Rice, 2003). Há indícios de que a atividade proteolítica das proteínas não estruturais esteja relacionada com a formação do complexo NS2BNS3. A NS2B possui relação com a ativação da função serina protease da NS3, portanto, atuando como importante co-fator (Lindenbach et al., 2007; Melino & Paci, 2007).

A proteína NS5 possui peso molecular em torno de 103 KDa, localiza-se no citoplasma e é a maior proteína entre os Flavivirus. NS5 é altamente conservada e atua como RNA polimerase RNA-dependente, mas também apresenta atividade de metiltransferase, envolvida na formação do terminal cap 5' do RNA viral (Chambers et al., 1990; Lindenbach et al., 2007; Melino & Paci, 2007).

Algumas proteínas não estruturais são capazes de interagir com vias do sistema imune inato, particularmente bloqueando a produção de IFN do tipo I, após a infecção. Esta inibição pode ocorrer, por exemplo, pelo bloqueio da fosforilação na via JAK-STAT pela NS4B (Munoz-Jordan et al., 2003; Munoz-Jordan et al., 2005), pela clivagem da proteína STING pelo complexo NS2B/3 (Rodriguez-Madoz et al., 2010; Yu et al., 2012) e pela degradação da proteína fosforilada STAT2 (pSTAT2) pela proteína NS5, impedindo sua translocação para o núcleo celular (Ashour et al., 2009; Rajsbaum et al., 2013).

1.1.3 Multiplicação do DENV

O DENV tem a capacidade de infectar diferentes tipos de células em humanos. As células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans) são os alvos primários. No entanto, existem evidências de que o vírus é capaz de infectar também linfócitos B, linfócitos T, células natural killer, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (Clyde et al., 2006).

A multiplicação do DENV ocorre no citoplasma e se inicia pela ligação do vírus a receptores presentes na superfície das células do hospedeiro por um processo conhecido como adsorção (Passo1 – Figura 2). Já foi visto que a suscetibilidade dos tecidos do hospedeiro ao vírus está relacionada com a

quantidade e distribuição desses receptores (Grove & Marsh, 2011). Apesar de existirem muitos estudos para determinar a(s) molécula(s) responsável(is) pelo reconhecimento do DENV pelas células alvo, um receptor específico ainda não foi identificado. No entanto, vários candidatos de natureza distinta (mamíferos e mosquito) surgiram, incluindo glicosaminoglicanos, como o sulfato de heparano, lectinas, a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), o receptor de manose (MR) de macrófagos, o lipopolissacarídeo (LPS) receptor CD14, proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 e chaperona GRP78 do retículo endoplasmático (RE) [Cruz-Oliveira et al., 2015].

Após a adsorção, a partícula viral é internalizada através de rotas distintas, que incluem endocitose mediada por clatrina (Passo 2 – Figura 2) ou por vias não clássicas independentes de clatrina, dependendo da célula hospedeira e do sorotipo do vírus (Cruz-Oliveira et al., 2015). Para os vírus envelopados, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma ocorre por um processo conhecido como desnudamento (Passo 4 – Figura 2) e depende da fusão do envelope do vírus com a membrana celular. No caso do DENV, a acidificação dos endossomos (Passo 3 – Figura 2) promove mudanças conformacionais em E que resultam na sua trimerização e, conseqüente, exposição do peptídeo de fusão. Esta exposição permite a fusão das membranas viral e celular e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Pierson & Kielian, 2013). Achados recentes mostraram que a proteína C também poderia estar envolvida neste processo, devido seu tamanho e sua carga altamente positiva, sendo importante na translocação do RNA dentro do citoplasma (Freire et al., 2013; Freire et al., 2014). Neste ambiente, a proteína C se dissocia do RNA que é traduzido em uma poliproteína por ribossomos associados à membrana do RE (Passo 5 – Figura 2). Essa poliproteína é processada por proteases celular e viral (Figura 1) produzindo proteínas estruturais e não estruturais (Lindenbach et al., 2007; Clyde et al., 2006).

Após a tradução, a replicação se inicia com a síntese de uma fita de senso negativo complementar ao RNA genômico que servirá como molde para a síntese do RNA viral. Por fim, o genoma viral é encapsidado pela proteína C e os nucleocapsídeos formados se acumulam no RE (Passo 6 – Figura 2) onde sofrem brotamento e migram para o Golgi para sua maturação (Passo 6 – Figura 2). Na maturação ocorre a clivagem proteolítica da proteína prM em M

pela protease celular furina (Passo 8 – Figura 2) e no momento da exocitose, a proteína E sofre um rearranjo, resultando na partícula madura que é então liberada no meio extracelular (Passo 9 – Figura 2) [Lindenbach et al., 2007; Clyde et al., 2006].

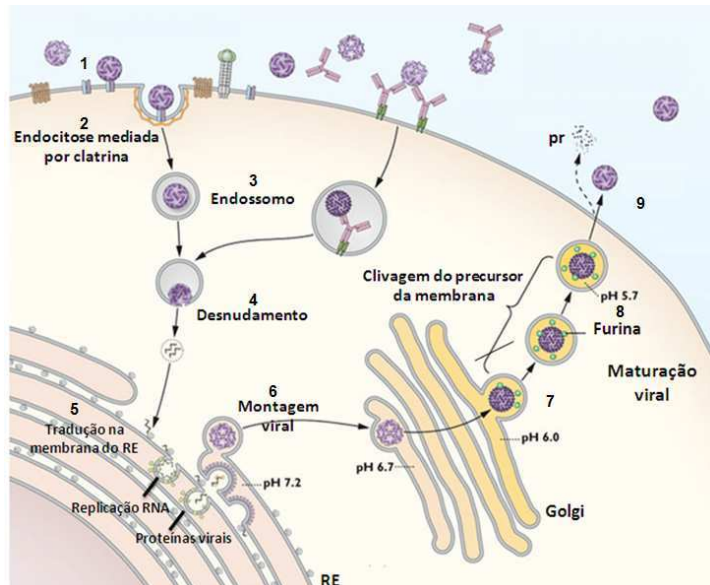


Figura 2: Esquema do ciclo de multiplicação do DENV no interior da célula hospedeira humana.

A partícula viral do DENV se liga na célula do hospedeiro por meio de interações ainda mal definidas. O vírus é internalizado através de endocitose mediada por clatrina, neste caso. Posteriormente, ocorre a formação de endossomos, que tem seu pH acidificado promovendo mudanças conformacionais na partícula, com posterior desnudamento. O genoma viral é traduzido no citoplasma da célula formando uma poliproteína que é processada posteriormente. A montagem viral ocorre no RE e a maturação no Golgi, caracterizada pela ação da enzima furina na prM. A partícula madura é então exocitada. Fonte: adaptado Fields Virology 6ª edição.

1.1.4 Quadro clínico de pacientes infectados pelo DENV

O curso clínico da dengue é considerado imprevisível. Embora a maioria dos pacientes apresente os sintomas clássicos da doença denominada Febre da Dengue (FD), estes podem evoluir para manifestações mais graves como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e/ou a Síndrome do Choque da Dengue (SCD) [Gregson & Edelman, 2003]. Existem também aqueles pacientes

assintomáticos que podem variar de 0,77 a 87% dependendo da população estudada (Teo et al., 2009). Uma estimativa feita por Bahtt e colaboradores (2013) mostrou que de 390 milhões de pessoas infectadas por ano, 300 milhões não apresentam sintomas clínicos graves o suficiente para serem identificados pelos sistemas de saúde. Até o momento, considerava-se que tais infecções assintomáticas ou com sintomas leves não apresentavam viremia em nível suficiente para infectar mosquitos, mas um estudo recente mostrou que indivíduos assintomáticos podem infectar mosquitos quando picadas. Esta descoberta foi de extrema importância, pois indivíduos assintomáticos são mais expostos a picadas de mosquitos do que indivíduos que apresentam os sintomas da doença, já que suas rotinas diárias não são interrompidas (Duong et al., 2015).

Os sinais e sintomas, que caracterizam a FD, aparecem cerca de 2 a 7 dias após o período de incubação do vírus, sendo eles febre alta, forte dor de cabeça, dor corporal e nos olhos, perda de apetite, fraqueza, prostração e, às vezes, vômitos. Em alguns casos esses sintomas são acompanhados por coceira, manchas vermelhas pelo corpo, pequenos sangramentos no nariz e nas gengivas. Em uma porção menor dos casos, a doença apresenta evolução muito mais severa, a FHD. Após 2 a 5 dias da infecção, a pessoa pode apresentar aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas, que podem evoluir para insuficiência circulatória e choque hipovolêmico. Normalmente, a FHD tem taxa de mortalidade entre 1 a 10 %, requerendo hospitalização e um cuidadoso controle hemodinâmico dos pacientes. Sem tratamento adequado, 50% dos pacientes em choque vão a óbito (Figueiredo et al., 1999; Edelman et al., 2005).

A gravidade da FHD é classificada em quatro categorias de acordo com sinais clínicos. Na categoria 1 estão classificados os casos que apresentam febre acompanhada de sintomas não específicos, com prova do laço positivo. Na categoria 2, além das manifestações da categoria 1, estão os casos que apresentam sangramento espontâneo, usualmente gengiva, nariz e pele. Na categoria 3 estão os casos que apresentam falha circulatória, com pulso rápido e fraco e hipotensão. Na categoria 4, choque profundo com ausência de pressão arterial e pulso não detectáveis (Gubler et al., 2007; Oishi et al., 2007).

As categorias 3 e 4 são denominadas Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Em todos os casos, nenhuma alteração histopatológica é observada nas células endoteliais, sugerindo que as alterações vasculares observadas na FHD e SCD são devidas às alterações funcionais ao invés de anatômicas (Gubler et al., 2007). As manifestações mais graves estão associadas às áreas onde circulam mais de um sorotipo viral ou onde houve uma sequência de epidemias causadas por diferentes sorotipos (Siqueira et al., 2005; Drumond et al., 2013).

Dificuldades neste sistema de classificação apresentado e o aumento de casos graves que não preenchiam os critérios para FHD, fizeram com que a Organização Mundial da Saúde implementasse uma nova classificação para os casos de dengue. Com isso, em 2014, o Brasil adotou a nova classificação. Atualmente os casos são classificados com relação aos níveis de gravidade da doença e podem ser divididos em: Dengue, Dengue com sinais de alarme (DCSA) e Dengue grave (DG). Os critérios para cada nível de classificação estão representados na Figura 3 (WHO, 2009).



Figura 3: Classificação dos casos de dengue adotada atualmente pela Organização Mundial da Saúde.

Os pacientes são classificados de acordo com a gravidade da doença e podem ser divididos em Dengue, Dengue com sinais de alarme (DCSA) e Dengue grave (DG).
Fonte: WHO, 2009.

1.1.5 Imunopatogenia da dengue

Diversos mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a resposta imunológica gerada contra o DENV e de que forma estão relacionadas à exacerbação das formas clínicas apresentadas pelo paciente no decorrer da infecção. Dentre os fatores que podem contribuir para as manifestações graves da dengue, destacam-se algumas hipóteses que envolvem os mecanismos imunológicos do hospedeiro e aspectos virais e existem fortes evidências de que a forma clínica da FHD esteja correlacionada a uma segunda infecção por DENV heterosorotípico (Monath, 1994; Whitehorn & Simmons, 2011).

A primeira hipótese conhecida como infecção dependente de anticorpos (antibody-dependent enhancement – ADE) postula que a presença de anticorpos anti-DENV específicos para determinado sorotipo causador da primeira infecção, se ligam ao sorotipo da infecção secundária, mas sem atividade neutralizante. Isto levaria ao aumento da infectividade de alguns tipos de células contendo receptores Fc γ , como os macrófagos. Além disso, o estímulo causado pela liberação de IFN- γ por células T CD4⁺ ativadas aumentariam a exposição de Fc γ na membrana dos macrófagos tornando-os mais susceptíveis ao vírus não neutralizado e isto resultaria no aumento da viremia, levando a uma doença mais grave (Halstead & O'Rourke, 1977; Halsted, 2003; Remy, 2014).

A segunda hipótese, conhecida como Original Antigenic Sin, envolveria os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Alguns pesquisadores acreditam que durante uma infecção secundária, células T de memória, específicas para o sorotipo da primeira infecção e com baixa avides para o DENV da infecção atual são ativadas preferencialmente no lugar das células T virgens. Isto gera uma resposta ineficiente na lise de células infectadas resultando em uma série de respostas anormais, deficiência na eliminação de corpos apoptóticos e secreção exacerbada de interleucinas. O aumento nos níveis de citocinas pode correlacionar-se com os casos graves de dengue, como a citocina TNF- α que está aumentada no soro de pacientes em alguns casos de FHD, e da citocina IL-10, que foi vinculada a diminuição do número de plaquetas circulantes. Pacientes com FHD também apresentam altos níveis de IL-6, CXCL-8 (anteriormente IL-8), IL-13, IL-18, comparados com aqueles com FD. Essas citocinas têm sido implicadas no aumento da permeabilidade vascular e no choque durante as infecções causadas pelo DENV (Halsted et al., 1983; Mustafa et al., 2001; Remy, 2014).

Por fim, outra hipótese bastante aceita é a Teoria Integral de Multicausalidade, proposta por pesquisadores cubanos. Nela, aliam-se vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais, virulência da cepa e de fatores individuais. A interação desses fatores de risco promoveria condições para a ocorrência de FHD (Palacios Serrano et al., 2001).

Outros mecanismos imunológicos também têm sido associados à FHD, tais como o excesso de formação de complexos imunológicos e a produção de

auto-anticorpos contra proteínas humanas (Burke & Monath, 2001; Wan et al 2013). Além disso, alguns estudos têm sugerido que células Th17 também seriam ativadas durante uma infecção causada pelo DENV e estariam relacionadas com o agravamento da doença, mas ainda não foi esclarecido o mecanismo utilizado pelo vírus para que isso aconteça (Jain et al., 2013).

Adicionalmente, a produção da proteína NS1 poderia estar envolvida na patogenia da dengue, pois, anticorpos anti-proteína NS1 podem ligar-se de forma cruzada a células endoteliais de pacientes infectados. Esta ligação estaria vinculada com a lise de células endoteliais pelo sistema complemento do hospedeiro, já que elevados níveis de C3a e C5a são observados no plasma de pacientes com FHD. Isso pode aumentar a permeabilidade vascular, agravando o quadro clínico do paciente (Lin et al., 2003; Martina et al., 2009).

1.1.6 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (WHO) considera a dengue a doença viral transmitida por mosquitos mais prevalente nos dias de hoje. O DENV é considerado endêmico em 128 países de regiões tropicais/sub-tropicais, causando altos índices de infecção na Ásia tropical, África, Austrália, Caribe e América Central e do Sul (WHO, 2013). Surtos de dengue têm ocorrido nos Estados Unidos desde 2009 (Bouri et al., 2012).

Uma estimativa feita por pesquisadores da Universidade de Oxford mostrou que o número de infecções causadas pelo DENV é o triplo das estimativas atuais da WHO. Eles estimaram que cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas por ano no mundo. Além disso, estima-se que quatro bilhões de pessoas vivam em áreas sob o risco de contágio pelo DENV (Bhatt, et al., 2013). A maior parte da população mundial (75%) exposta ao vírus é da região do Sul Asiático, seguida pelas Américas onde cerca de 30 países são acometidos pela doença (WHO, 2009).

1.1.6.1 Dengue no Brasil

Em 2015, o Brasil teve o índice recorde de 1.649.008 casos prováveis de dengue no país, até a semana epidemiológica (SE) 52 (04/01/2015 a

02/01/2016). O número é o maior registrado na série histórica, iniciada em 1990. O recorde anterior foi em 2013, com 1.452.489 de casos prováveis.

Até a SE 52, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%) [MS/UFs].

1.1.7 Diagnóstico

Os testes para o diagnóstico laboratorial da dengue desempenham um papel crucial na assistência ao paciente. Visto que os sintomas da dengue são similares aos de outras doenças febris, a disponibilidade de testes específicos é extremamente importante para confirmação da doença em casos suspeitos e deveria ser uma das prioridades na saúde pública. Além disso, o diagnóstico é importante para vigilância da doença e o monitoramento dos sorotipos circulantes do vírus.

Várias técnicas têm sido aplicadas para diagnóstico laboratorial da infecção viral em amostras de soro ou tecidos. O isolamento viral é considerado padrão-ouro, pois é a evidência direta de infecção viral. Essa metodologia permite diagnosticar a dengue na fase aguda, quando o título de anticorpos ainda está baixo. Esta técnica usualmente é realizada utilizando-se células de mosquitos *Aedes albopictus* (C6/36), mas pode ser realizada também com a inoculação de amostras em mosquitos ou em cérebro de camundongos, mas não rotineiramente. A identificação do sorotipo do DENV é feito por imunofluorescência. O único problema deste método é o armazenamento das amostras, que devem ser mantidas a -70°C (Guzmán & Kourí, 1996; Kao et al., 2005).

Outra forma utilizada para o diagnóstico da dengue são os métodos moleculares, que incluem RT-PCR e o RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Diversos protocolos de amplificação genômica têm sido empregados. No caso da RT-PCR, o protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (1992) é o mais utilizado e sugerido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que além de detectar a presença do RNA viral, é possível identificar o sorotipo causador da infecção. Apesar da alta sensibilidade, os melhores resultados são

obtidos quando são utilizados soros coletados precocemente. A qRT-PCR apresenta o mesmo princípio da RT-PCR, porém o seu produto é detectado à medida que é amplificado, além da quantificação viral, com maior rapidez e sensibilidade, devido a utilização de intercalantes de DNA (Sistema SYBR® Green) ou sondas marcadas nas duas extremidades por fluoróforos distintos (TaqMan®) [MacKay et al., 2002]. Em 2002, na epidemia de DENV-3, essa metodologia permitiu demonstrar que os casos fatais apresentavam maior viremia. Porém, uma grande desvantagem da utilização de tais técnicas para o diagnóstico da dengue, é a necessidade de uma plataforma de instrumentação, sondas marcadas com elevado custo e alta habilidade técnica e suporte (De-Araújo et al., 2009).

Os métodos sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico da dengue, pois permitem confirmar o maior número de casos e vários testes já estão disponíveis comercialmente. A captura de anticorpos pelo Mac-Elisa (IgM antibody capture enzyme-linked immuno sorbet assay), o método mais utilizado apresenta uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 90% e 98%, respectivamente, mas apenas quando utilizados após cinco ou mais dias depois do início dos sintomas.

Entretanto, o IgG-ELISA (teste de detecção de anticorpos IgG), que apresenta especificidade de 94,1% e sensibilidade de 89%, testes de inibição de hemaglutinação (IH) e de neutralização por redução de placas (PRNT) também podem ser empregados (Gubler, 1998). Outro teste sorológico bastante utilizado é a pesquisa de NS1. Atualmente é disponibilizado comercialmente duas apresentações deste ensaio: uma na forma de um teste imunoenzimático, que possibilita trabalhar com um maior número de amostras, e outra como teste rápido de imunocromatografia, com resultado em 15 minutos. Um fator complicador para detecção de NS1 em infecções secundárias é a rápida resposta de anticorpos anti-NS1 de reação cruzada que formam imunocomplexos com esses antígenos. Em tais casos, a NS1 é raramente detectada no soro do paciente entre 5 e 7 dias após o início dos sintomas (Lima et al., 2010). Além disso, o uso da proteína NS1 tem uma alta especificidade (82 a 100%), mas tem moderada sensibilidade (mediana 64%, intervalo de 34-72%). A sensibilidade é mais baixa nas infecções secundárias, quando comparada com as infecções primárias. Em outras palavras, um teste

NS1 negativo não exclui a possibilidade da doença (Guzman et al., 2010; Chatterji et al., 2011). Uma importante desvantagem dos testes sorológicos são as reações cruzadas que podem ocorrer devido a alta homologia existente entre os Flavivirus e por achados clínicos que mostram semelhança entre os sintomas encontrados em pacientes infectados pelo DENV e por outras viroses também transmitidas pelo *Aedes aegypti*, como por exemplo, o YFV, ZIKV e Chikungunya virus (CHIKV), sendo necessário o diagnóstico diferencial entre as doenças (Freire, 2014). Outro ponto importante no diagnóstico diferencial é uma identificação mais rápida e eficaz de uma epidemia causada por algum destes vírus, diminuindo a possibilidade de resultados falsos positivos para uma determinada virose (Hayes, 2009; Lima et al., 2010; Carneiro & Travassos, 2016).

Atualmente, há uma grande necessidade de testes para o diagnóstico que sejam de baixo-custo, seguros e simples, que combinem sensibilidade e especificidade, com aplicabilidade tanto em laboratório como no campo (Tripathi et al., 2007).

1.1.8 Vacinas candidatas

Dois fatores principais têm dificultado enormemente o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue: uma vacina segura precisa promover imunidade duradoura contra os quatro sorotipos de dengue e, inexistente um modelo animal, para se prever como as respostas imunes induzidas pela vacina iriam interferir com os mecanismos imunopatogênicos da FHD e a variabilidade existente entre os DENV. Mesmo existindo diversas vacinas contra dengue em fase de desenvolvimento, nenhuma se mostrou completamente eficaz até o momento (Tabela 1) [Yauch & Shresta, 2014].

Uma das primeiras abordagens para obtenção de vírus vivos atenuados baseou-se na troca dos genes prM-E, que compõe o envelope viral dos Flavivirus (Bray & Lai, 1991). Baseada nesta metodologia, a vacina que se encontra em estágio de desenvolvimento mais avançado em termos de estudos clínicos (fase 3) é a CYD-TDV (ChimeriVax), licenciada pela Sanofi Pasteur. Para construção desta vacina foi utilizado o vírus vacinal da Febra Amarela, cepa 17D, que teve seus genes prM-E substituídos pelos mesmos genes dos

quatro sorotipos do DENV. Os resultados dos testes iniciais dessa vacina em crianças na Tailândia (fase 2b), administrada em regime de três doses com intervalos de 4 a 6 meses, revelaram que, apesar de ser observada a indução de altos níveis de anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos do DENV, não houve proteção contra o sorotipo DENV-2. A eficácia alcançada pela vacinação com esses vírus quiméricos ficou em torno de 30% (Sabchareon et al., 2012). Um segundo estudo clínico de fase 3 foi finalizado na Ásia com 10.275 crianças de 2 a 14 anos. O objetivo foi avaliar a eficácia de proteção da vacina tetravalente após 3 doses (0, 6 e 12 meses). A vacinação promoveu eficácia protetora de 56,5%, mas novamente induziu baixa proteção contra o DENV-2 (35%), em oposição à proteção contra os sorotipos 1 (50%) e 3 (75%). Além disso, foi visto que a vacinação foi mais eficaz em indivíduos de 12 a 14 anos do que em grupos mais jovens, de 2 a 4 anos, o que pode indicar que a vacinação tenha ampliado imunidade preexistente. O aspecto mais importante deste estudo foi o da redução de indivíduos com FHD logo após a primeira dose (80%) [Capeding et al., 2014]. Testes com esta mesma vacina também foram realizados na América Latina (Brasil, Colômbia, México, Honduras e Porto Rico) com 20.875 crianças, de 9 a 16 anos. Este estudo mostrou 60% de eficácia e 80% de redução do risco de hospitalização (Villar et al., 2015; Guy & Jackson, 2016).

Outro tipo de vacina em desenvolvimento são as vacinas de vírus atenuados cuja virulência é reduzida devido a uma mutação accidental. Algumas vacinas baseadas nesta metodologia chegaram a ser testadas em humanos (fase 1 e 2). Uma delas foi desenvolvida na Tailândia (Mahidol University of Thailand) e outra nos Estados Unidos (Walter Reed Army Institute of Research - WRAIR) [Sabchareon et al 2004; Simasathien et al 2008]. A vacina tetravalente da Universidade de Mahidol foi licenciada pela Sanofi Pasteur e baseou-se na passagem dos quatro sorotipos virais em células de rim de cão (PDK) e células de rim de macaco verde africano (GMK). Em testes realizados em humanos (fase 1) foram detectadas reações adversas e houve baixa soroconversão para os sorotipos 1, 2 e 4. Com isso, os testes com esta vacina foram descontinuados. A outra vacina tetravalente, desenvolvida nos EUA, foi licenciada pela GlaxoSmithKlein (GSK) e o vírus foi atenuado utilizando células PDK e células pulmonares de macacos Rhesus (FRhL). Um teste inicial,

realizado em 86 adultos mostrou que a vacina é segura e moderadamente imunogênica, mas para confirmar estes dados será feito este teste em um número maior de pessoas (Thomas et al., 2013).

A indústria farmacêutica japonesa Takeda também está na corrida pelo desenvolvimento de uma vacina contra dengue. A empresa comprou, em 2013, a americana Inviragen, que estava desenvolvendo uma vacina contra a dengue. Esta vacina, conhecida como TDV, é tetravalente, recombinante e é baseada em uma forma atenuada do DENV-2, que fornece o 'esqueleto' genético para substituições dos genes prM-E dos outros sorotipos do DENV. Testes de fase 1 e 2 mostraram que esta vacina foi bem tolerada em crianças e adultos com idade entre 1 e 45 anos, independente se já tiveram exposição prévia ao DENV. A TDV também induziu a produção de anticorpos neutralizantes e soroconversão contra todos os quatro DENV, bem como as respostas mediadas por células T que podem ser necessárias para uma ampla proteção contra a dengue (Yauch et al., 2010; Han et al, 2012). Estudos clínicos adicionais estão em andamento para iniciar os testes de fase 3 (Osorio et al., 2015).

Outra vacina de vírus atenuado foi desenvolvida pelo Laboratório de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID - NIH) nos EUA. Para atenuação do vírus, foram deletadas 30 bases ($\Delta 30$) na região 3'UTR do genoma dos vírus DENV-1 e DENV-4 (rDENV1 $\Delta 30$ e rDENV4 $\Delta 30$), porém essa deleção não foi eficiente para os vírus DENV-2 e DENV-3. Para estes dois sorotipos, vacinas monovalentes foram desenvolvidas pela construção de quimeras possuindo os genes prM-E dos DENV-2 e DENV-3 na estrutura do rDENV4 $\Delta 30$ (Whitehead et al., 2003). Testes clínicos de fase 1 mostraram a segurança e a imunogenicidade destas vacinas monovalentes. Formulações tetravalentes, denominadas TetraVax-DV, estão em andamento. No Brasil, a licença dessa tecnologia foi vendida para o Instituto Butantan e testes clínicos vêm sendo realizados pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) e na Tailândia. Atualmente o Butantan está recrutando participantes para testes de fase 2 utilizando esta vacina (Thomas, 2014).

Vacinas constituídas do DENV inativado também vêm sendo produzidas. Uma delas, nomeada de TDEN-PIV está sendo desenvolvida pelo WRAIR, em parceria com a GSK. O vírus foi inativado por formalina e os testes se encontram em fase 1 para avaliação de adjuvantes (Putnak et al., 2005; Yauch & Shresta, 2014).

Uma vacina recombinante de subunidade, V180, está sendo produzida pela Merck em um sistema de expressão realizado em células de *Drosophila* S2 e consiste na proteína E truncada na porção C-terminal. Testes em primatas não-humanos avaliando a imunogenicidade desta vacina já foram realizados e no momento, testes em humanos estão em andamento na Austrália com a combinação de três doses da vacina associada ao adjuvante Iscomatrix (Coller et al., 2013). Já o Centro de Pesquisa Médico Naval dos Estados Unidos (NMRC) está produzindo uma vacina tetravalente de DNA (TVDV) e baseia-se nos genes prM e E. Resultados de fase 1 demonstraram um perfil seguro e com imunogenicidade moderada (Beckett et al., 2011).

Diferente dessas metodologias descritas acima, outros grupos de pesquisa têm dedicado esforços para desenvolver uma vacina contra a dengue utilizando vetores virais recombinantes. Exemplo disso é o vírus da varíola que foi modificado para desenvolvimento de vacinas (Vaccinia Ankara Modificado - MVA). Este vírus MVA foi utilizado para expressar a forma truncada da proteína E do DENV-2 e foi capaz de induzir proteção em camundongos desafiados com o vírus selvagem (Men et al. 2000; Volz et al. 2015). O MVA também foi utilizado por um grupo de pesquisa, porém expressando a proteína E do DENV-3, com diferentes elementos inseridos nas extremidades do gene exógeno e foi visto que quando a proteína E possui um peptídeo sinal, responsável pelo seu direcionamento para o RE, gera uma ativação de células T CD8+ maior do que quando esta proteína se encontra no citoplasma (Quinan et al., 2014).

Como descrito acima, muitos estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver uma vacina eficaz contra a dengue. Tais resultados revelam a importância do estudo com maior profundidade das diferentes modalidades de resposta imune na proteção contra a dengue. Essa abordagem não deve se limitar à resposta contra a proteína E, também deve ser investigada a resposta a outras proteínas do vírus, como vêm sendo feito.

Tabela 1: Vacinas em desenvolvimento

Vacina	Abordagem	Metodologia	Empresa	Esquema	Situação atual
CYD-TDV (ChimeriVax)	Atenuada, tetravalente, quimérica	Substituição dos genes prM e E da amostra vacinal da Febre Amarela 17D pelos mesmos genes de cada sorotipo do DENV	Sanofi Pasteur	3 doses, 1 ano	Fase 3 concluída
TDV	Atenuada, tetravalente, quimérica	Atenuação do DENV-2, que fornece o 'esqueleto' genético para substituições dos genes prM-E dos outros sorotipos do DENV	Takeda (antiga Inviragen)	2 doses, 90 dias	Fase 2 concluída
TetraVax-DV	Atenuada, tetravalente, quimérica	Deleção de 30 bases ($\Delta 30$) na região 3' UTR do genoma dos vírus DENV-1 e DENV-4	NIH, Butantan	Dose única	Fase 2 em andamento
V180	Tetravalente, recombinante de subunidade	Glicoproteína E truncada produzida em células de <i>Drosophila</i>	Merck	3 doses, 90 dias	Fase 1 em andamento
TVDV	DNA	Genes prM e E	NMRC/WRAIR		Fase 1 concluída
TDEN-PV	Inativada	Vírus inativados e purificados	GlaxoSmithKline	2 doses, 60 dias	Fase 1 em andamento

2 JUSTIFICATIVA

A Dengue é uma doença que afeta cerca de 390 milhões de pessoas sendo responsável por cerca de 25.000 mortes anualmente no mundo, causando grande impacto na saúde pública e na economia de vários países. Grandes esforços vêm sendo despendidos pela comunidade científica visando desenvolver uma vacina contra a dengue. Entretanto, ainda não foi obtido um resultado satisfatório, pois existem grandes obstáculos para o desenvolvimento de tal vacina: (i) a vacina precisa promover imunidade duradoura contra os quatro sorotipos de DENV, (ii) inexistem uma metodologia adequada, ou seja, um modelo animal, para prever como as respostas imunes induzidas pela vacina iriam interferir com os mecanismos imunopatogênicos da dengue grave e, (iii) ainda existem lacunas no entendimento do perfil de resposta imune protetora para dengue. A forma mais eficaz de evitar a infecção por DENV seria através do combate aos mosquitos transmissores. Contudo, o controle e a erradicação da dengue, através do combate ao vetor, têm se tornado cada vez mais difícil devido à superpopulação, ao crescimento urbano e ao grande aumento das viagens nacionais e internacionais. Por isso, uma das estratégias ideais para o controle do DENV é o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz. Deste modo, uma alternativa às estratégias vacinais clássicas, é a utilização de proteínas quiméricas artificiais. Essa estratégia permite a construção de proteínas contendo epítomos sabidamente imunogênicos para os quatro sorotipos de DENV – não necessariamente conservados entre os sorotipos - e que podem ser arrançados de forma a gerar uma resposta protetora equilibrada. Assim, essa estratégia seria uma alternativa racional para o desenvolvimento de vacinas contra Dengue, reduzindo os riscos de uma vacina desbalanceada.

Além de serem utilizadas como alvos vacinais, estas proteínas quiméricas podem ser utilizadas também para desenvolvimento de testes de diagnóstico para a dengue. É de senso comum que os testes de diagnóstico laboratorial desempenham um papel crucial na assistência ao paciente. A disponibilidade de testes específicos para dengue é extremamente importante para confirmação da doença em casos suspeitos e deveria ser uma das prioridades na saúde pública, ainda mais no momento em que vivemos atualmente, com a

co-circulação do DENV, CHIKV e ZIKV, que apresentam semelhança entre os sintomas encontrados em pacientes infectados por algum deles, surgindo a necessidade de intensificar os estudos para criação de um teste que não gere resposta cruzada entre eles. Além disso, o diagnóstico é importante para vigilância da doença e o monitoramento dos sorotipos circulantes do vírus. Apesar de já existirem inúmeras técnicas de diagnóstico, essa estratégia é um diferencial, pois é possível construir antígenos, para utilização em testes de diagnóstico, contendo epítomos sabidamente imunogênicos para os quatro sorotipos de DENV, além da possibilidade de arranjos a serem reconhecidos por anticorpos presentes em soros de pacientes sem resposta cruzada com outros arbovírus e com maior segurança.

Diante deste contexto, a hipótese deste trabalho é de que proteínas quiméricas, contendo epítomos imunogênicos do DENV, desencadeiam uma resposta imunológica tetravalente balanceada, gerando assim uma vacina segura e testes de diagnóstico eficientes para dengue.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter proteínas quiméricas contendo epítopos imunogênicos dos quatro sorotipos do DENV para utilização no desenvolvimento de vacinas e/ou diagnósticos para o Dengue virus.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar e produzir proteínas quiméricas contendo epítopos imunogênicos dos quatro sorotipos do DENV.
- Testar a reatividade in vitro das proteínas quiméricas utilizando soros de pacientes infectados e indivíduos nunca infectados.
- Avaliar a imunogenicidade da proteína quimérica EnvE_{PII} em camundongos C57BL/6 e BALB/c.
- Avaliar a resposta imune humoral e celular dos camundongos imunizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho dos minigenes que codificam para as proteínas quiméricas

Ao longo do desenvolvimento desse projeto, 11 proteínas quiméricas foram desenhadas e produzidas. Uma proteína quimérica piloto (denominada qDV) contendo epítomos da proteína do C, prM, NS1, E e outras 10 proteínas quiméricas, contendo epítomos das proteínas E e NS1 dos DENV 1-4 (Tabela 2 – página 42).

4.1.1 Proteína qDV

A proteína qDV foi desenhada pelo Dr. Carlos Eduardo Calzavara. Para tal, foi feito o download de todas as sequências de genomas completos de DENV depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/dengue/>) e selecionadas aquelas isoladas apenas na América do Sul (16 de DENV1, 21 de DENV2, 39 de DENV3 e 6 de DENV4). As sequências foram agrupadas de acordo com o sorotipo viral e seus genomas alinhados (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), utilizando-se o “setup” padrão da matriz de alinhamento. Dessa forma, 4 sequências-consenso foram obtidas; uma para cada sorotipo viral. Cada uma das 4 sequências-consenso obtidas foram então submetidas a busca por similaridade de sequências utilizando-se o algoritmo Blast-P (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). As 4 sequências com maior homologia (uma sequência de cada sorotipo viral) foram descarregadas e submetidas à busca por epítomos imunogênicos. As sequências selecionadas foram então realinhadas para identificação das sequências de aminoácidos consenso entre os sorotipos DENV 1-4. As regiões do genoma dos DENV envolvidas diretamente na indução de resposta imune contra o vírus foram avaliadas in silico. Os epítomos mais imunogênicos foram identificados através do servidor BepiPred 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) utilizando-se o “setup” padrão do algoritmo. Foram selecionados 13 epítomos de proteínas do DENV: 3 da região do capsídeo, 3 do envelope, 2 da pr/M e 5 da NS1 (Figura 4). Esses epítomos

foram arranjados e entre eles adicionados espaçadores baseados no aminoácido glicina. Posteriormente, essa sequência de aminoácidos foi submetida a diversas análises bioquímicas como análise de hidrofobicidade e exposição ao solvente, dentre outras (<http://web.expasy.org/protscale/> e <https://www.predictprotein.org>). A sequência de aminoácidos foi então resubmetida ao servidor BepiPred para verificar se os epítomos anteriormente selecionados foram mantidos. A sequência de aminoácidos foi então retrotraduzida para a geração de uma sequência de nucleotídeos codificando para a proteína quimérica recém-construída (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Após as análises *in silico*, um minigene foi desenhado (1) de modo a permitir a expressão de uma proteína quimérica usando diferentes sistemas de expressão sem necessidade de etapas de PCR e adição ou remoção de sequências, bastando apenas utilizar as enzimas de restrição adequadas para cada sistema de expressão, e (2) editado e otimizado para expressão em bactérias e leveduras, permitindo maior eficiência de uso de códons, menor formação de estruturas secundárias de RNA, diminuição do conteúdo de G e C, exclusão de sítios de restrição indesejáveis, sem afetar a sequência de aminoácidos final. O minigene qDV foi então submetido a síntese comercial (GeneSCRIPT, USA).

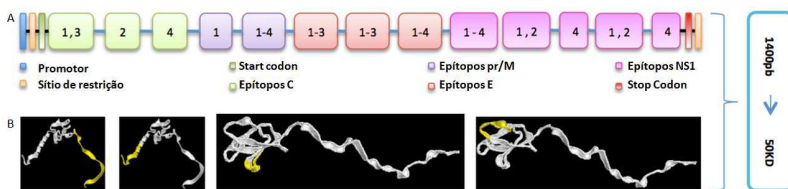
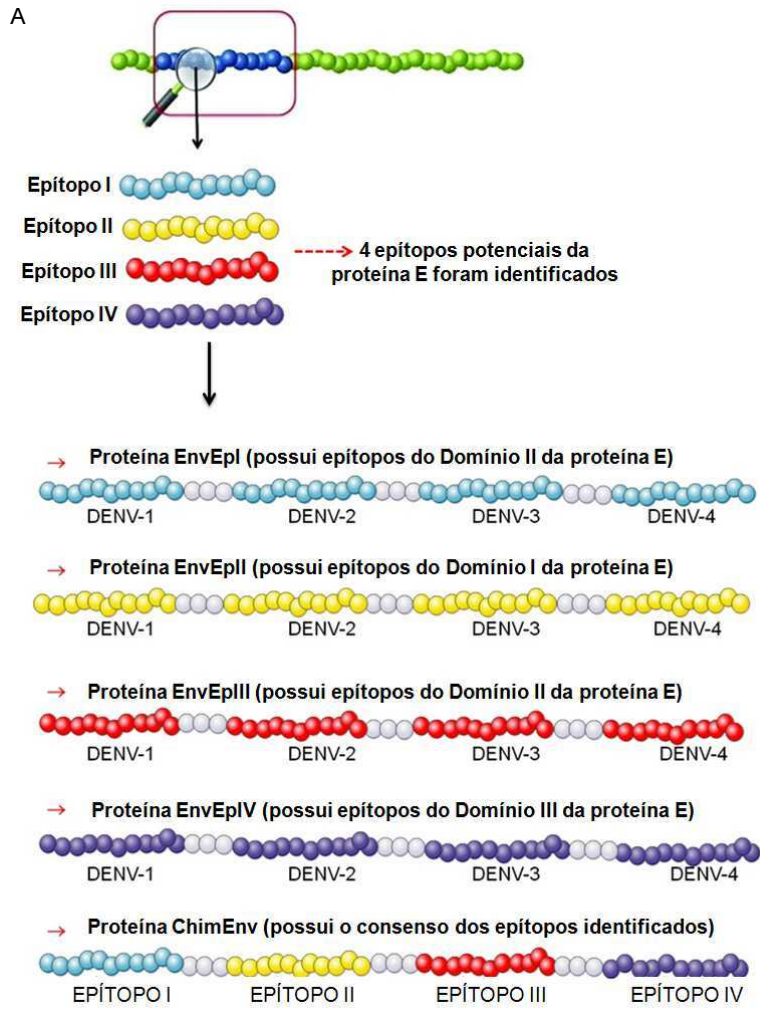


Figura 4: Estrutura esquemática da proteína qDV. A: Todos os 13 epítomos selecionados da região do C, pr/M, E e NS1 foram arranjados para construção da proteína quimérica, gerando um minigene de 1400 pb que codifica para uma proteína de 50 kDa. B: Os epítomos foram modelados *in silico* para avaliação de sua estrutura, acessibilidade e outros parâmetros estruturais.

4.1.2 Outras proteínas quiméricas utilizadas no estudo

Além da proteína qDV, outras dez proteínas quiméricas contendo epítomos do DENV foram construídas utilizando uma metodologia semelhante, estas por sua vez, pela Dr. Bárbara Resende Quinan. Entretanto, para aumentar a precisão da predição de epítomos, a ferramenta BepiPred foi utilizada com o score threshold de 0.7 (duas vezes maior do que o parâmetro padrão) e, além disso, a predição de epítomos foi realizada utilizando apenas a sequência consenso das proteínas E e NS1 para cada um dos sorotipos. Oito epítomos não-conservados (quatro da proteína NS1 e quatro da proteína E) foram selecionados. Estes epítomos foram arranjados para construção de dez proteínas quiméricas compostas por: (1) quatro epítomos não-conservados para cada um dos sorotipos (quatro proteínas quiméricas contendo epítomos da proteína E e quatro contendo epítomos da proteína NS1), (2) uma proteína quimérica contendo quatro epítomos consenso para proteína do envelope e (3) uma proteína quimérica contendo quatro epítomos consenso para proteína NS1. Um esquema representativo da construção destas proteínas está mostrado na Figura 5 e Tabela 2 (página 42).



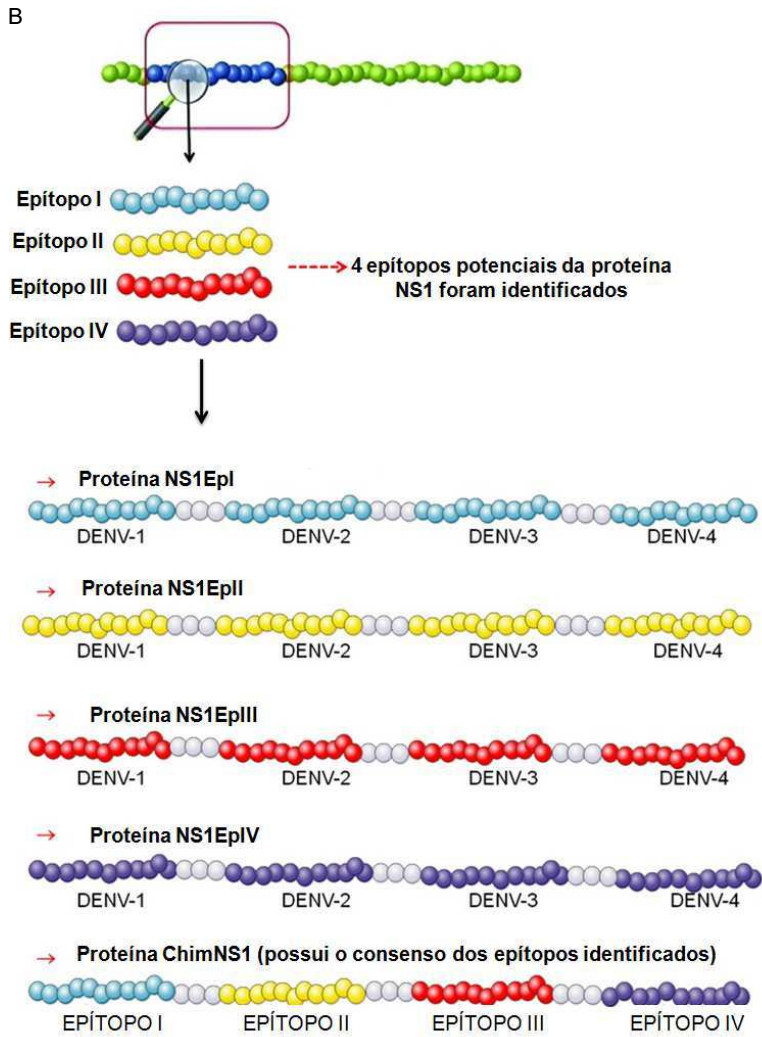


Figura 5: Representação esquemática da construção das proteínas quiméricas. Utilizando ferramentas de bioinformática, oito epítapos potenciais foram selecionados. Estes epítapos foram combinados para construção de dez proteínas quiméricas diferentes (cinco contendo epítapos do E (A) e cinco contendo epítapos da NS1(B)).

Tabela 2: Proteínas quiméricas produzidas no estudo e seus respectivos números de aminoácidos e tamanhos.

Identificação	Número de aminoácidos	Tamanho da proteína
qDV	466	50 KDa
NS1EpI (Epitopo potencial 1)	110	13 KDa
NS1EpII (Epitopo potencial 2)	147	16 KDa
NS1EpIII (Epitopo potencial 3)	157	17 KDa
NS1EpIV (Epitopo potencial 4)	119	13 KDa
ChimNS1 (Consenso dos 4 epítopos potenciais para NS1)	137	15 KDa
EnvEpI (Epitopo potencial 1)	151	17 KDa
EnvEpII (Epitopo potencial 2)	193	21 KDa
EnvEpIII (Epitopo potencial 3)	156	18 kDa
EnvEpIV (Epitopo potencial 4)	151	16 KDa
ChimEnv (Consenso dos 4 epítopos potenciais para E)	166	18 KDa

4.2 Produção das proteínas quiméricas

4.2.1 Preparação de bactérias *E. coli* DH5 α , M15 e BL21 competentes

Para o preparo de bactérias competentes para a transformação, uma alíquota de 50 μ L de culturas das bactérias *E. coli* DH5 α , M15 e BL21 foram inoculadas em tubos cônicos de 50 mL contendo 5 mL de meio Luria Broth (meio LB: NaCl, 10 g; peptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g por litro) sem antibiótico. Os tubos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm a 37°C por 18 a 24 horas. No dia seguinte, 1 ml de cultura foi inoculado em Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio LB sem antibiótico incubado em agitador

orbital a 200 rpm a 37°C, até que fosse obtida uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,4 e 0,6. Após, a cultura foi transferida para tubos cônicos de 50 ml e deixada por 15 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. O pellet bacteriano foi delicadamente ressuspensionado em 25 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$, 0,1M; HEPES, 0,1M) gelada e deixado em banho de gelo por mais 20 minutos. Novamente, foi feita a centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após, o pellet foi dissolvido delicadamente em 1 ml de $CaCl_2$ /glicerina ($CaCl_2$ a 0,1 M; glicerina a 15%) gelada e alíquotas de 50 μ L foram distribuídas em microtubos de 0,6 mL, previamente resfriados em banho de gelo. As bactérias competentes foram armazenadas a -70°C até momento do uso.

4.2.2 Preparação dos minigenes que codificam para as proteínas quiméricas (insertos)

4.2.2.1 Amplificação do plasmídeo pUC57 clonado com cada um dos minigenes

Os minigenes sintéticos que codificam para as proteínas quiméricas, foram obtidos comercialmente da GenScript inseridos no plasmídeo pUC57 nos sítios de restrição das enzimas BamHI e HindIII.

Para obtenção de DNA plasmidial das construções pUC57-qDV, pUC57-NS1Epl, pUC57-NS1EplII, pUC57-NS1EplIII, pUC57-NS1EplIV, pUC57-ChimNS1, pUC57-EnvEpl, pUC57-EnvEplII, pUC57-EnvEplIII, pUC57-EnvEplIV pUC57-ChimEnv suficiente para os experimentos de clonagem dos minigenes nos vetores de expressão, tais plasmídios foram amplificados na bactéria *E. coli* DH5 α . Para tal, bactérias DH5 α competentes foram transformadas com 100 ng de cada construção plasmidial.

Em todos os experimentos de transformação foi utilizado o método químico. Aos tubos contendo 50 μ L de bactérias competentes, foram adicionados os plasmídios de interesse e, estes incubados em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos, e, então, resfriadas em banho de gelo por 5

minutos. Todo o volume foi então transferido para tubos de 2 mL contendo 950 μ L de meio LB (NaCl, 10 g; Peptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g por litro). Em seguida, as bactérias foram incubadas a 37°C, a 200 rpm em agitador orbital, por 30 min. Para plaquear, 100 μ L da cultura de bactérias foram transferidos para placa contendo LB-ágar adicionado de 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma). As placas foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica por 18 a 24 horas.

4.2.2.2 Extração plasmídeo pUC57 clonado com cada um dos minigenes por meio de lise alcalina (Miniprep)

Para extração do DNA plasmidial, os clones transformantes foram inoculados em 10 mL de meio LB adicionados de 100 μ g/mL ampicilina e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C, a 200 rpm. Os DNA plasmidiais foram obtidos utilizando-se o kit QIAprep Miniprep (Qiagen) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As preparações de DNA plasmidiais obtidas foram quantificadas por espectrofotometria no Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a -20°C.

4.2.2.3 Restrição enzimática para digestão dos minigenes

Para a obtenção dos minigenes de interesse inseridos em pUC57, aproximadamente 2 μ g de cada construção plasmidial foram digeridos com 1U de cada enzima de digestão: a saber BamHI Fast digest e HindIII Fast digest (Fermentas). A reação de digestão foi incubada por 2 horas a 37°C. A verificação dos produtos digeridos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.2.2.4 Eletroforese em gel de agarose

A separação dos produtos de digestão foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% adicionado do intercalante de DNA comercial SybrSafe® (Life

Technologies) em tampão TAE 0,5X (40mM Tris; 20 mM ácido acético; 1mM EDTA) a 50-100 V, para visualização dos fragmentos sob luz ultravioleta. Geis analíticos foram preparados para a verificação da eficiência da digestão com enzimas de restrição e também geis preparativos para o recorte das bandas dos DNA de interesse para posterior purificação e utilização em reações de ligação plasmídeo+inserto.

4.2.2.5 Purificação dos insertos utilizando gel de agarose

Os fragmentos de interesse, correspondentes aos minigenes, foram purificados a partir de um gel de agarose 1% preparativo. Para isso, as bandas correspondentes aos fragmentos foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi sob luz UV e os respectivos DNA foram extraídos da agarose utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os DNA purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, comparativamente a uma preparação de DNA de concentração conhecida e também por espectrofotometria no Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e foram armazenadas a -20°C.

4.2.3 Preparação dos vetores de expressão

4.2.3.1 Amplificação dos vetores de expressão pET-21, pET 28 TEV e pQE-9

Transformações para amplificação plasmidial também foram realizadas com os vetores de expressão vazios (100 ng de cada) como descrito no item 4.2.2.1.

Como vetores plasmidiais de expressão foram utilizados: (i) pQE-9 (Qiagen), que expressa a proteína quimérica em fusão com uma repetição de 6 resíduos de histidina em sua porção N-terminal, (ii) pET21(Novagen) que expressa a proteína recombinante em fusão com uma repetição de 6 resíduos de histidina em sua porção C-terminal e (iii) pET 28 TEV (Carneiro, F. R. et al., 2006) que expressam a proteína quimérica em fusão com uma repetição de 6 resíduos de histidina em suas porções C- e N-terminal (Figura 6).

4.2.3.2 Extração dos vetores plasmidiais de expressão por lise alcalina (Miniprep)

Para realização das clonagens, os vetores de expressão vazios também foram extraídos por lise alcalina utilizando-se o kit QIAprep Miniprep (Qiagen) descrito no item 4.2.2.2.

4.2.3.3 Restrição enzimática dos vetores de expressão

Cerca de 1 µg dos vetores de expressão pET21, pQE-9 e pET 28 TEV foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para digerir os insertos: BamHI e HindIII (Fermentas). A reação de digestão foi incubada por 2 horas a 37°C. A verificação dos produtos digeridos também foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.2.3.4 Purificação dos vetores de expressão digeridos

Para purificação dos vetores de expressão digeridos, foi utilizado o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os DNA purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, comparativamente a uma preparação de DNA de concentração conhecida e por espectrofotometria no Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e foram armazenadas a -20°C.

4.2.4 Ligação dos insertos em vetores de expressão

Para subclonagem dos insertos nos plasmídios pQE-9, pET21 e pET 28 TEV foi feita uma reação de ligação contendo 50 a 100 ng de plasmídio digerido e o inserto na proporção vetor:inserto de 1:5 adicionados da enzima T4 ligase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante da enzima. A reação foi incubada a 4°C de um dia para o outro.

O cálculo da quantidade inserto necessária foi feito através da fórmula:
$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho (Kb) inserto} \times \text{razão molar inserto/vetor}}{\text{tamanho (Kb) do vetor}}$$

Após ligação foram obtidas as seguintes construções:

- pQE-9-qDV, pET 28 TEV-qDV
- pET-21-NS1Epl, pET-21-NS1EplII, pET-21-NS1EplIII, pET-21-NS1EplIV, pET-21-ChimNS1
- pET-21-EnvEpl, pET-21-EnvEplII, pET-21-EnvEplIII, pET-21-EnvEplIV, pET-21-ChimEnv

4.2.5 Amplificação das ligações utilizando bactérias competentes

Para amplificação do material obtido na ligação, este também foi utilizado para transformar bactérias competentes seguindo o protocolo explicado no item 4.2.2.1. A bactéria *E. coli* M15 foi utilizada para as transformações com as construções que utilizaram como vetor de expressão o pQE-9 e a *E. coli* BL21 para construções com os vetores de expressão pET-21 ou pET 28 TEV. Para tal, a cultura transformada foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos, e após, 800 µL do sobrenadante foi removido sendo o pellet bacteriano dissolvido nos 100 µL de sobrenadante restante. Tal suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB-ágar contendo 100 ug/mL de ampicilina (para *E. coli* BL21 transformadas com as construções que utilizaram como vetor o pET-21), 100 ug/mL de ampicilina e 25 ug/mL de kanamicina (para *E. coli* M15 transformadas com as construções que utilizaram como vetor o pQE-9) ou 25 ug/mL de kanamicina (para *E. coli* BL21 transformadas com as construções que utilizaram como vetor o pET 28 TEV).

4.2.6 Digestão das construções plasmidiais para verificação da presença do inserto

As construções plasmidiais pQE-9-qDV e pET 28 TEV-qDV foram digeridas com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, como descrito no item 4.2.2.3, para a verificação da presença do inserto. Para tal, cerca de 300 ng de plasmídeo foram digeridos simultaneamente com as enzimas de restrição BamHI e HindIII (Fermentas). Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz UV.

4.2.7 PCR de colônia das construções plasmidiais para verificação da presença de inserto

No caso das outras construções plasmidiais: pET-21-NS1Epl, pET-21-NS1Epll, pET-21-NS1Eplll, pET-21-NS1Eplv, pET-21-ChimNS1, pET-21-EnvEpl, pET-21-EnvEpll, pET-21-EnvEplll, pET-21-EnvEplv, pET-21-ChimEnv, a presença de inserto foi verificada por PCR.

Para isso, os clones transformantes foram inoculados em 500 μ L de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e incubados a 37°C por aproximadamente 5 h sob agitação a 200 rpm em agitador orbital. Para a PCR, foram utilizados 2 μ L desta cultura bacteriana como molde, 5 pmol dos iniciadores T7 senso e anti-senso (iniciadores específicos para região do promotor T7 do vetor de expressão pET-21 – Tabela 3), 2 μ L de tampão STR 10X Promega (500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2 mM dNTP), 0,3 μ L de Taq polimerase (Promega; 5 U/ μ L) e H₂O q.s.p. o volume final de 20 μ L. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, pareamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; seguidos de um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz UV.

4.2.8 Sequenciamento das construções plasmidiais

As construções plasmidiais foram submetidas a uma reação de sequenciamento para verificarmos se a inserção do minigene no vetor de expressão foi correta.

Para realização do sequenciamento foram utilizados na reação cerca de 400 ng da construção plasmidial, 5 pmoles de iniciadores específicos (Tabela 3), 5 μ L de Dye Terminator do kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) para obtermos um volume final de 10 μ L, de acordo com as instruções do fabricante.

A reação ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos, seguida de 35 ciclos: 95°C por 20 segundos; pareamento a 56°C por 15 segundos; extensão a 60°C por 2 minutos.

Posteriormente, foi feita a precipitação das reações de sequenciamento para eliminação dos nucleotídeos não incorporados de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A leitura foi feita em sequenciador automático ABI 3730 (Life Technologies) da plataforma de sequenciamento Sanger do CPqRR. As análises foram feitas no servidor Multalin (disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/> - Corpet, F. 1988).

Tabela 3: Iniciadores específicos utilizados na reação de PCR e sequenciamento para verificação da inserção correta dos minigenes nos vetores de expressão.

INICIADOR	SEQUÊNCIA
T7 senso ¹	5'taatacgaactcactataggg3'
T7 anti-senso ¹	5'gctagttattgctcagcgg3'
pQE-9 senso ²	5'cccgaaaagtgccacctg3'
pQE-9 anti-senso ²	5'gttctgaggtcattactgg3'

¹ Iniciadores utilizados nas construções plasmidiais: pET-21-NS1Epl, pET-21-NS1Epll, pET-21-NS1Eplll, pET-21-NS1EplV, pET-21-ChimNS1, pET-21-EnvEpl, pET-21-EnvEpll, pET-21-EnvEplll, pET-21-EnvEplV, pET-21-ChimEnv e pET 28 TEV-qDV.

² Iniciadores utilizados na construção plasmidial pQE-9-qDV.

4.2.9 Expressão das proteínas quiméricas por indução com IPTG

A verificação da expressão das proteínas quiméricas foi feita pela indução com 0,75 mM de IPTG. Para isso, os clones selecionados foram inoculados em tubos cônicos de 50 mL, contendo 5 ml de meio LB líquido adicionados de ampicilina (100 µg/mL) e/ou 25 µg/mL de kanamicina. As culturas foram incubadas a 37°C de um dia para o outro sob agitação a 200 rpm em agitador orbital. No outro dia, 100 µL de cultura das bactérias transformadas com cada um dos clones, foram inoculados, em tubos cônicos de 50 mL, contendo 10 ml de meio LB líquido adicionado de ampicilina (100 µg/mL) e/ou 25 µg/mL de kanamicina. As culturas foram incubadas a 37°C por cerca de 2 horas sob agitação a 200 rpm em agitador orbital até atingirem a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,6. Antes de induzir a expressão, foi

retirado em um tubo controle, 1 ml da cultura que foi centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. A expressão de proteínas foi induzida através da adição de 0,4 mM a 1 mM de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ao meio a 37°C por cerca de 4 horas. Posteriormente, 1 ml da cultura foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Após centrifugação, o pellet bacteriano foi dissolvido em 50-200 μ L de tampão de amostra 2X (63 mM Tris HCl; 10% glicerol, 2% SDS, 0.0025% azul de bromofenol; pH 6.8) e aquecido a 100°C por 5 minutos.

Após a verificação da expressão das proteínas quiméricas, repetiu-se este processo, porém em larga escala, utilizando 500 mL de meio LB.

4.2.10 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10% para a verificação da expressão e purificação das proteínas recombinantes de interesse

Tanto as expressões quanto as purificações foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) 10% - 20%, realizada em um tampão Tris-glicina/SDS (Tris-Cl, 25 mM; glicina, 250 mM; SDS, 0,1%) e com uma voltagem de aproximadamente 100 V. Os geis foram corados com Coomassie blue (metanol, 50%; ácido acético, 10%; Coomassie blue, 0,25%) por 30 minutos e descorados com uma solução descorante (metanol, 45%; ácido acético, 10%) por cerca de 2 horas.

4.2.11 Purificação das proteínas quiméricas por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas quiméricas foi feita em condições desnaturantes. Após a indução da expressão, as células foram centrifugadas por 30 minutos, 3000 rpm a 4°C e ressuspensas com um tampão de guanidina (NaH_2PO_4 , 100 mM; Tris-Cl, 10 mM; GuCl, 6 M – pH=8) com volume correspondente a 10% do volume da cultura. O extrato bruto bacteriano foi centrifugado novamente por 2 h, a 3000 rpm a 15°C e o sobrenadante foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade a temperatura ambiente, utilizando 3 mL de resina de níquel (Qiagen). A coluna foi então

lavada com o tampão de guanidina, citado acima, e posteriormente com um tampão de uréia (NaH_2PO_4 , 100 mM; Tris-Cl, 10 mM; Uréia, 8 M – pH=8). Para terceira lavagem foi utilizado o mesmo tampão de uréia, mas com pH=6,3 e posteriormente com pH=5,9. A eluição foi feita utilizando este mesmo tampão, mas com o pH=4,5.

4.2.12 Dosagem de proteínas por BCA

Para dosagem das proteínas purificadas o kit BCA – Protein assay kit (PIERCE) que detecta de 20 a 2000 ug/mL de proteína foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 25 ul de cada amostra a ser testada e a leitura foi feita a 562 nm utilizando um leitor de placas Spectra Max M5. As concentrações das amostras foram obtidas com base na curva padrão de BSA albumina bovina (BSA).

4.3 Testes de reatividade das proteínas quiméricas com soros de indivíduos infectados e nunca infectados por DENV

4.3.1 Amostras utilizadas

A execução dos experimentos utilizando soros de indivíduos já infectados e nunca infectados pelo DENV foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG pelo número de parecer ETIC-172/99 (anexo 10.1).

As amostras utilizadas para realização dos testes de reatividade das proteínas quiméricas foram cedidas para nosso grupo de pesquisa por diferentes instituições como pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4: Amostras utilizadas nos testes de reatividade das proteínas quiméricas com soros de indivíduos infectados e nunca infectados pelo DENV

Amostra	Número de amostras utilizadas	Instituição fornecedora da amostra	Experimento realizado com estas amostras
Soro de indivíduos infectados pelo DENV IgM positivos	4 (um de cada sorotipo do DENV)	Fundação Ezequiel Dias	Western blot (Item 4.3.2)
Soro de indivíduos infectados pelo DENV IgG positivos	4 (um de cada sorotipo do DENV)	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães	Western blot (Item 4.3.2)
Pool de soros de pacientes já infectados pelo DENV	1	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA (Item 4.3.3)
Soro de paciente já infectado pelo DENV 1	2	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA (Item 4.3.3)
Soro de paciente já infectado pelo DENV 2	2	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA (Item 4.3.3)
Soro de paciente já infectado pelo DENV 3	1	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA (Item 4.3.3)
Soro de paciente já infectado pelo DENV 1, 2 e 3	1	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA (Item 4.3.3)
Soros de pacientes nunca infectados pelo DENV	3	Universidade Federal de Minas Gerais	ELISA e Western Blot

4.3.2 Western blot

A fim de testarmos a reatividade das proteínas contra anticorpos presentes em soro de pacientes infectados pelo DENV e de indivíduos saudáveis nunca infectados, foram realizados ensaios de Western blot. Para isso as proteínas quiméricas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS- PAGE) 10% em um tampão de Tris-glicina-SDS (Tris, 25mM; Glicina, 250mM; SDS, 0,1%) a 100V. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Qiagen), também por eletroforese a 300 mA, no gelo, com a utilização de uma solução gelada de transferência (Tris-Base, 25mM; Glicina, 192mM; Metanol, 20%; SDS, 0,1%). Após a transferência, as membranas foram então bloqueadas com uma solução com leite em pó desnatado a 5% (Molico,

Nestlé). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C, com soros de pacientes infectados pelo DENV e de indivíduos saudáveis (Tabela 4) na diluição 1:200. As membranas foram então lavadas com TBS Tween (Tris- HCl, 1M; NaCl, 5M; Tween 20, 0,05%), e incubadas por 1 hora nessa mesma solução com anticorpo humano anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:30.000 (Anti-Human IgG (Fc specific) - Alkaline Phosphatase Sigma-A9544) ou anti IgM (Anti-Human IgM (κ-chain specific) – Alkaline Phosphatase Sigma - A3437). Para revelação, foi utilizada a solução NBT/BCIP (Thermo Scientific) e a análise dos resultados foram feitas através da observação de bandas diferenciadas na membrana de nitrocelulose.

4.3.3 ELISA

Outro teste realizado para análise de reatividade das proteínas químéricas foi o ensaio imunoenzimático de ELISA, com soros de indivíduos já infectados ou nunca infectados pelo DENV, gentilmente cedidos pela Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Para isso, após experimentos de análise de dose resposta de cada uma das proteínas testadas, uma placa de 96 poços foi sensibilizada a 4°C com 10 ug/mL das proteínas NS1Epl, NS1EplIII, EnvEplII, EnvEplIII e qDV, diluídas em um tampão de carbonato (10 nM Na₂CO₃, 10 nM NaHCO₃) pH de 9,6. Cerca de 18 h após a sensibilização, a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,5% Tween 20 (Sigma-Aldrich) e foi bloqueada com uma solução de caseína 1% por 2h a temperatura ambiente. Os soros dos pacientes foram utilizados na diluição 1:50 (Tabela 4) na mesma solução de bloqueio e 100 uL dessas diluições foram adicionados em cada poço e incubados por 1h a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente da mesma forma que a lavagem anterior e, então, foi realizada uma segunda incubação de 1h, a temperatura ambiente, utilizando um conjugado enzimático anti-IgG humano ligado à enzima peroxidase na diluição de 1:70.000 (Anti-human IgG (whole molecule) – Peroxidase. Sigma A8667). O experimento foi revelado utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com a adição de ácido

clorídrico 1M. A leitura da absorbância das reações foi realizada a 450 nm lidas em espectrofotômetro de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices).

4.4 Avaliação da imunogenicidade da proteína EnvEplI

4.4.1 Obtenção dos animais experimentais

A execução dos experimentos in vivo do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) pelo número de licença LW-30/15 (anexo 2).

Os camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, machos, com idade de 8 a 9 semanas foram adquiridos no biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Todos os experimentos in vivo foram realizados no biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz e os animais foram manuseados de acordo com o manual de ética em experimentação animal da instituição.

4.4.2 Imunização de camundongos utilizando a proteína EnvEplI

O experimento de imunização foi feito em duplicata utilizando um total de 80 camundongos (20 da linhagem BALB/c e 20 da linhagem C57BL/6 em cada experimento). Optou-se pela realização dos experimentos em duas linhagens de camundongos diferentes, devido ao perfil de susceptibilidade/resistência de cada uma delas. Dessa forma, poderemos analisar qual modelo animal é mais apropriado para realização de futuros experimentos utilizando proteínas quiméricas do DENV.

Para a realização da imunização de camundongos com a proteína EnvEplI, 20 camundongos, de cada linhagem, foram divididos em 4 grupos diferentes:

- Grupo PBS
- Grupo EnvEplI
- Grupo Alúmem

- Grupo Alú + EnvEplI

Tanto os camundongos BALB/c quanto os C57BL/6 foram submetidos a um protocolo de três imunizações, com intervalos de 15 dias, como representado na Figura 7. Nas imunizações foram inoculados 100 μ l de formulação vacinal, via subcutânea, no dorso do animal. A formulação vacinal continha, dependendo do grupo em questão: (i) 100 μ l de PBS estéril (Grupo PBS); ou (ii) 10 μ g da proteína EnvEplI diluída em PBS estéril (Grupo EnvEplI); ou (iii) 30% (v/v) de alumínio Rehydragel L. V. (Reheis, Berkeley Heights) diluído em PBS estéril (Grupo Alúmen); (iv) ou 30% (v/v) de alumínio Rehydragel L. V. com 10 μ g da proteína EnvEplI (Grupo Alú+EnvEplI). Nos dias 0 e 37 foram realizadas coletas de sangue por via retro orbital para análise da resposta humoral. A eutanásia dos animais foi feita no dia 49 para coleta do baço e sangue e análise da resposta celular.

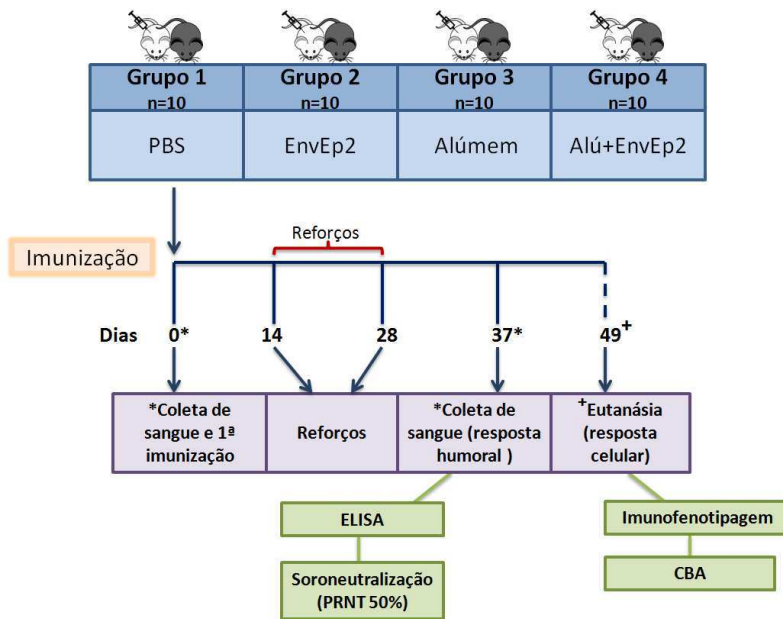


Figura 7: Esquema da imunização com a proteína EnvEplI em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 para avaliação da resposta humoral e celular. Camundongos das duas linhagens foram divididos em 4 grupos diferentes: PBS; EnvEplI; Alúmem; Alú+EnvEplI (n=10 para cada grupo) sendo o protocolo de imunização feito como descrito no item 4.4.2.

4.4.2.1 Avaliação da resposta humoral

4.4.2.1.1 ELISA

A produção de anticorpos nos animais imunizados foi verificada por meio de testes imunoenzimáticos (ELISA) realizados nos soros dos animais que tiveram seu sangue coletado nove dias após a última imunização. As placas Maxisorp® Nunc-Immuno de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/mL da proteína EnvEPII diluída em tampão carbonato (10 nM Na₂CO₃, 10 nM NaHCO₃ pH=9,6) de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com soro fetal bovino (SFB) [Sigma Aldrich] 10% diluído em PBS (tampão fosfato 0,15M pH=7,2) por 2h a 37°C. As amostras de soro foram diluídas 1:200 em tampão de bloqueio e incubadas por 2h a 37°C. As placas foram então lavadas com PBS contendo 0,5% Tween 20 (Sigma-Aldrich) e em seguida com PBS puro. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos secundários, diluídos em tampão de bloqueio, anti-IgG total (Anti-Mouse IgG – Peroxidase antibody produced in rabbit – Diluição: 1:10.000) [Sigma Aldrich], anti-IgG 1 (Goat Anti-Mouse IgG₁-HRP – Diluição: 1:4.000) [Southern Biotech], anti-IgG_{2a} (para BALB/c) [Goat Anti-Mouse IgG_{2a}-HRP – Diluição: 1:4.000] [Southern Biotech] ou anti IgG_{2c} (para C57BL/6) [Goat Anti-Mouse IgG_{2c}-HRP – Diluição: 1:4000] [Southern Biotech] marcados com peroxidase e incubados por 1h a 37°C. A reação foi revelada utilizando-se 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) [Sigma-Aldrich]. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de uma solução de H₂SO₄ a 2 M. A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectra Max M5 - Molecular Devices).

4.4.2.1.2 Soroneutralização

4.4.2.1.2.1 Células BHK21

Linhagem celular BHK21 é derivada de fibroblastos de rim de hamster *Mesocricetus auratus* neonato de um dia de idade. O cultivo das células BHK-21 foi feito utilizando-se meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) [Cultilab, Campinas] contendo 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e

0,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco BRL) e incubação em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Tais células foram utilizadas nos experimentos de titulação viral. Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4.2.1.2.2 Dengue virus

Neste trabalho utilizou-se o Dengue virus 3 (DENV-3), cedido pelo Dr. Flávio Fonseca com o título de $5,2 \times 10^4$ pfu/mL. Esta amostra viral foi isolada de pacientes com dengue do município de Ribeirão Preto – SP.

4.4.2.1.2.3 Ensaio PRNT₅₀

Os soros dos camundongos imunizados com a proteína EnvE_{PII} foram testados por soroneutralização para avaliar a presença de anticorpos neutralizantes anti-DENV-3. Os soros murinos foram aquecidos a 56 °C por 30 min para inativar o complemento, imediatamente antes do uso, e foram diluídos serialmente em meio DMEM nas razões de 1:10 a 1:160 para determinação do título de anticorpos neutralizantes. Para tal, 180 µL de uma suspensão de DENV-3 com cerca de 50 pfu de DENV, foram adicionadas a 180 µL da diluição do soro e incubados a temperatura ambiente por 1h sob agitação. Em seguida, 170 µL desta diluição foram adicionados à monocamada de cultura de células BHK-21 crescidas por 48h, em meio DMEM (Cultilab) com 5% de SFB. Além disso, 150 µL do mesmo DMEM (Cultilab) usado nas diluições, foram adicionados a uma câmara por placa para o controle de células. Depois da adsorção viral, o inóculo foi desprezado e, em seguida, foi adicionado 1 mL de meio 199 suplementado com antibióticos, 5% de SFB e 1% de CMC (carboximetilcelulose) [Sigma Aldrich]. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias. Observações do efeito citopático viral ao microscópio foram feitas em intervalos de 24 horas. Após período de incubação, as células foram fixadas em solução de formaldeído a 3,7% de um dia para o outro e coradas com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em PBS. Cada soro foi testado em duplicata e as placas de lise foram

contadas para se obter a média do número observado nas duas câmaras. A presença de anticorpos neutralizantes foi determinada a partir da diluição em que houve, pelo menos, 50% de redução na infecção (soroneutralização de 50%, PRNT₅₀) quando comparado ao controle de vírus.

4.4.2.2 Avaliação da resposta celular

4.4.2.2.1 Cultura de esplenócitos

Os baços dos camundongos imunizados foram coletados 49 dias após a primeira imunização para obtenção dos esplenócitos e avaliação da resposta celular contra a proteína EnvE_{PII}. Os baços foram macerados em filtro de 70 µm (Cell strainers – Falcon) para obtenção de uma suspensão de células que foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 1300 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. As hemácias presentes no pellet foram lisadas utilizando-se 9 mL de água destilada e 1 mL de PBS 10X. Os tubos foram novamente centrifugados por 10 min a 1300 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen). Os esplenócitos foram contados utilizando-se o contador automático Countess® Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen).

Os esplenócitos (1×10^6 células/mL) foram, então, plaqueados em placas de cultura de 96 poços com fundo em “U” (Becton Dickinson - BD), e no volume final de 200 µL por poço. Cada poço foi adicionado ou não da proteína EnvE_{PII}, na concentração de 2 µg/poço, em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de SFB inativado (Sigma Aldrich), 3% de solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen) e 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 6 h, 16 h ou 24 h.

4.4.2.2.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

O ensaio de imunofenotipagem celular foi realizado seguindo protocolo previamente publicado (Belkaid, 2008). Após incubação de 6, 16 e 24 horas das culturas, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C e após o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C. Posteriormente, 20 μ L de Fc blocking solution (BSA a 2%) foram adicionados por poço. A BSA tem a função de bloquear a porção Fc dos anticorpos e diminuir a possibilidade de ligações inespecíficas. Após 30 min de incubação a 37°C com a BSA, foram adicionados à suspensão celular, os anticorpos monoclonais, diluídos em tampão fosfato 0,015 M, pH 7,2; 0,5% BSA (PBS-wash), específicos para moléculas de superfície celular para avaliação de células T (CD3) e suas subpopulações (CD4 e CD8). A ativação celular de linfócitos, determinada pela presença da molécula CD25, também foi avaliada, assim como a molécula CD74. As especificações dos anticorpos utilizados estão descritas na Tabela 5. Após incubação por 30 min a 4°C, as células foram lavadas duas vezes com PBS-wash. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células fixadas com solução fixadora (formaldeído a 2%; pH 7,2). As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSFortessa (Becton Dickinson), selecionando-se a fluorescência das populações de linfócitos. Cem mil eventos foram adquiridos. Controles isotípicos foram utilizados em todos os experimentos.

Tabela 5: Anticorpos utilizados para imunofenotipagem celular

Marcador	Fluorescência	Clone	Atividade
CD3 (BD Horizon)	BV605	145-2c11	Identificação de linfócitos T
CD4 (Biolegend)	PerCP-Cy5.5	RM4-4	Identificação de linfócitos T auxiliares
CD8 (BD Horizon)	PE-CF594	53-6.7	Identificação de linfócitos T citotóxicos
CD25 (BD Pharmigen)	PE	PC61	Receptor de cadeia α de IL-2 em linfócitos; molécula importante na ativação intermediária de linfócitos
CD74 (BD Pharmigen)	FITC	In-1	Co-receptor de MIF (Fator de inibição de migração de macrófagos)

4.4.2.2.3 Avaliação do padrão de citocinas nos sobrenadantes de cultura por citometria de fluxo

Os níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura estimuladas ou não com a proteína EnvEplI no tempo de 24 h foram quantificados utilizando-se o BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, (Becton Dickinson), que emprega uma mistura de 7 esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas de camundongos detectadas no canal de fluorescência 3 (FL3). A utilização de uma mistura de esferas permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra.

Nesse estudo, a metodologia sugerida pelo fabricante foi modificada conforme descrito a seguir: em uma placa de 96 poços de fundo "U" (Becton Dickinson) 25 μ L do sobrenadante de cultura de esplenócitos, previamente centrifugados, foram adicionados em seus respectivos poços. Alíquotas de 25

uL dos padrões de citocinas foram submetidas à diluição seriada com o diluente G (solução diluente tamponada), em tubos de poliestireno de 5 mL, para que ficassem nas seguintes concentrações:

- “Top standard” (TS) – 5000 pg/mL
- 1:2 – 2500 pg/mL
- 1:4 – 1250 pg/mL
- 1:8 – 625 pg/mL
- 1:16 – 312,5 pg/mL
- 1:32 – 156 pg/mL
- 1:64 – 80 pg/mL
- 1:128 – 40 pg/mL
- 1:256 – 20 pg/mL
- Controle negativo: 25 uL de diluente G apenas

Além dos sobrenadantes de cultura, os padrões também foram transferidos para a placa de 96 poços. Posteriormente, 15 uL da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram transferidos para a placa destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Posteriormente, foram adicionados 17 uL de um coquetel de anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE) (Human Inflammation PE Detection Reagent) em cada um dos poços e as misturas foram incubadas por 3h, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob agitação em um agitador orbital de placas a 170 rpm. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 uL da solução “Wash Buffer” e centrifugadas a 400xg, por 10 minutos a 18°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado. Após a incubação, foram adicionados 200 μ L de solução “Wash Buffer”, para ressuspensão das esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo FACScan® (BD).

Inicialmente, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de distribuição pontual FL3 x FL2, onde as sete esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina presente na amostra (Figura 8A e 8B).

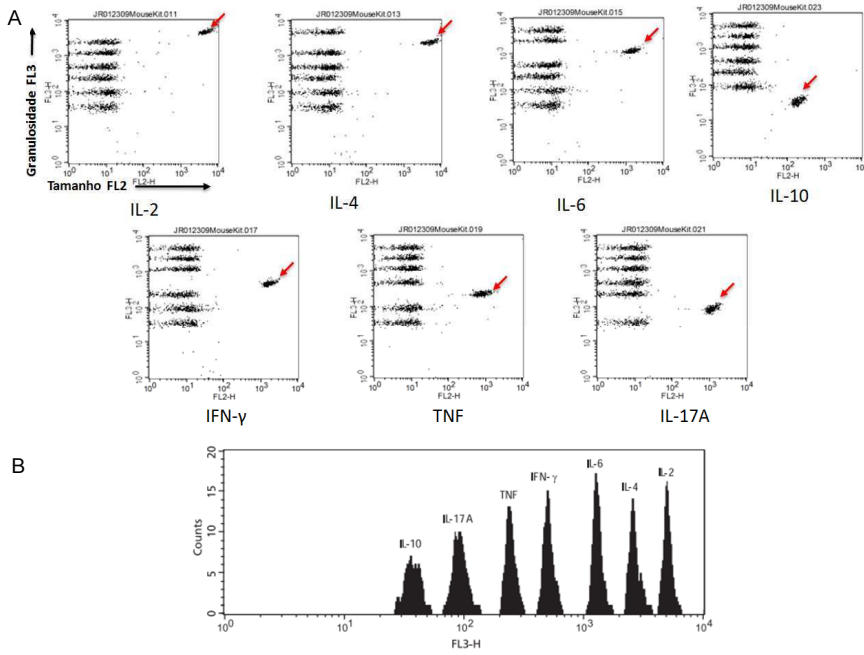


Figura 8: Representação esquemática da análise de citocinas presentes no soro de camundongos, através do ensaio de CBA.

A: Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de distribuição pontual FL2xFL3. B: Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL2) em gráficos de distribuição pontual FL2xFL3, proporcional à concentração de cada citocina presente nas amostras.

4.5 Análise estatística

Para análise dos resultados obtidos nos experimentos para avaliação da imunogenicidade da proteína EnvEPII em camundongos, a análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico ANOVA- seguido de Tukey, com o objetivo de detectar diferenças entre as médias dos grupos estudados. O nível de significância definido foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos clones produtores das proteínas quiméricas utilizadas no estudo

Os minigenes correspondentes a cada uma das proteínas quiméricas produzidas foram sintetizados comercialmente e foram fornecidos clonados no vetor pUC57 (sítios de restrição: BamHI e HindIII). Assim, para as subclonagens nos vetores de expressão, as construções em pUC57 foram digeridas com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, para a liberação do fragmento (minigene) permitindo assim as suas respectivas subclonagens nos vetores pQE-9, pET 28 TEV ou pET-21 (coluna 3 da Tabela 6). Os fragmentos (minigenes) purificados foram ligados aos vetores pQE-9, pET 28 TEV ou pET-21, previamente digeridos com as mesmas enzimas, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase como descrito no item 4.2.4 de Materiais e Métodos.

Tabela 6: Identificação das proteínas produzidas.

1. Identificação da proteína	2. Identificação após clonagem em vetor de expressão	3. Tamanho do minigene (pb)	4. Tamanho do amplificado para confirmação da clonagem
qDV	pQE-9-qDV pET 28 TEV-qDV	1400	Confirmação realizada por digestão
NS1EpI	pET-21-NS1EpI	261	446
NS1EpII	pET-21-NS1EpII	372	557
NS1EpIII	pET-21-NS1EpIII	402	587
NS1EpIV	pET-21-NS1EpIV	288	473
ChimNS1	pET-21-ChimNS1	342	527
EnvEpI	pET-21-EnvEpI	384	569
EnvEpII	pET-21-EnvEpII	510	695
EnvEpIII	pET-21-EnvEpIII	399	584
EnvEpIV	pET-21-EnvEpIV	384	569
ChimEnv	pET-21-ChimEnv	429	614

Os produtos de ligação (coluna 2 da Tabela 6) foram utilizados para transformar quimicamente bactérias *E. coli* da linhagem BL21, no caso dos vetores pET-21 ou pET-28 TEV ou bactérias *E. coli* M15 no caso do vetor pQE-9. A seleção dos clones transformantes foi realizada meio LB contendo ampicilina (BL21+pET-21), ampicilina+kanamicina (M15+pQE-9) ou kanamicina (BL21+pET-28 TEV). A verificação da presença dos insertos de interesse nos clones transformantes, foi feita através da escolha aleatória de algumas colônias que foram crescidas para realização de PCR ou terem seus respectivos plasmídios extraídos para digestão plasmidial.

Para a confirmação da presença do inserto por digestão, os plasmídios obtidos (pET 28 TEV-qDV e pQE-9-qDV) foram digeridos com as enzimas BamHI e HindIII. A Figura 9 mostra um gel de agarose a 1% representativo dos diversos experimentos para clonagens realizadas. Na Figura 9A, observamos a liberação de um fragmento de 1400 pb indicado pela seta branca referente ao inserto qDV sendo liberado do plasmídio pUC57. Este fragmento foi purificado

e utilizado nos experimentos de subclonagem em vetores de expressão. Nas canaletas 3 a 5 e 8 a 10 (setas brancas) pode-se verificar a liberação do fragmento de 1400 pb, correspondente ao minigene qDV, clonado nos vetores de expressão pET 28 TEV e pQE-9, respectivamente.

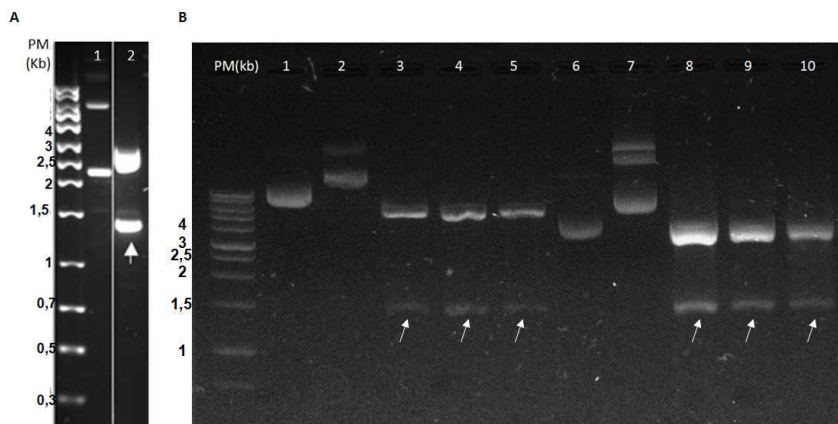


Figura 9: Clonagem do minigene qDV nos plasmídios pET 28 TEV e pQE-9. Gel de agarose a 1% corado com GelRed (Biotium) e visualizado em transiluminador UV, representativo dos diversos experimentos para a clonagem do minigene qDV nos vetores de expressão. A: Canaletas (1) pUC57-qDV não digerido; (2) pUC57-qDV digerido com BamHI e HindIII. B: Canaletas (1) pET 28 TEV sem inserto e não digerido; (2) pET 28 TEV-qDV não digerido; (3 a 5) pET 28 TEV-qDV obtido de três colônias diferentes digerido com BamHI e HindIII; (6) pQE-9 sem inserto e não digerido; (7) pQE-9-qDV não digerido; (8 a 10) pQE-9-qDV obtido de três colônias diferentes digerido com BamHI e HindIII. As bandas de aproximadamente 1400 pb, indicada pelas setas brancas, corresponde ao minigene qDV. As bandas com tamanhos moleculares variando entre 1,5 e 6 Kb correspondem aos vetores utilizados para as clonagens. PM: Padrão de tamanho molecular (1Kb High Range DNA ladder (Fermentas)).

A confirmação da presença do inserto nos clones transformantes das demais construções plasmidiais foi feita pela PCR utilizando-se iniciadores específicos (Tabela 3).

A Figura 10 mostra um gel de agarose a 1% representando os tamanhos dos amplificadores obtidos por PCR para as subclonagens realizadas utilizando-se os vetores de expressão que tinham como inserto uma sequência com epítomos para proteína NS1. Como mostrado na coluna 4 da Tabela 6, os amplificadores possuem tamanhos que variam de 440 pb a 590 pb.

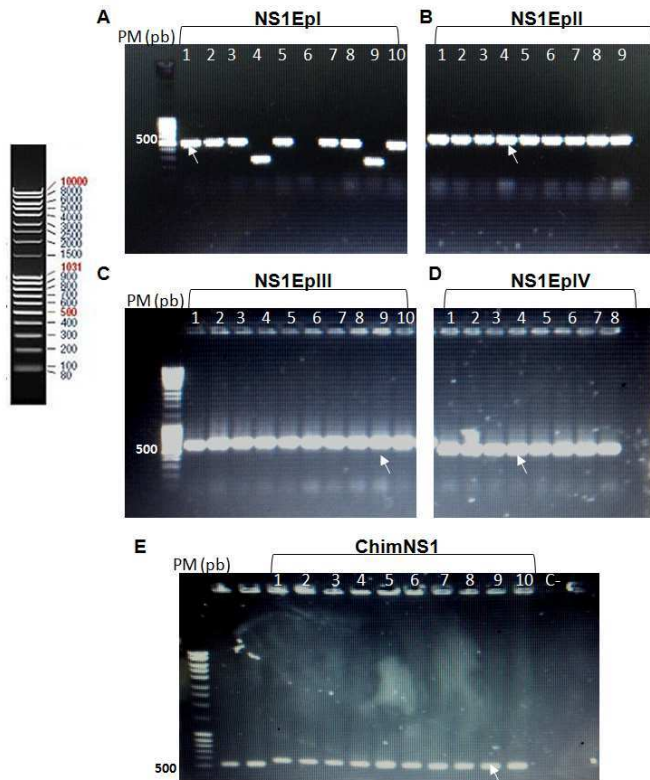


Figura 10: Confirmação da presença dos insertos (minigenes) que codificam para proteínas quiméricas contendo epítomos para NS1. As culturas dos clones bacterianos da linhagem BL21 transformados com as construções plasmidiais pET-21-NS1Epl (A), pET-21-NS1EplII (B), pET-21-NS1EplIII (C), pET-21-NS1EplIV (D) e ChimNS1 (E) foram submetidas a PCR para a verificação da presença do inserto que codificam para cada uma das proteínas quiméricas. Os números 1 a 10 representam cada colônia selecionada. As colônias indicadas com uma seta vermelha foram selecionadas para continuação dos experimentos. PM: padrão de peso molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix 80 – 10000 pb.

Para os vetores de expressão que receberam como inserto uma sequência com epítomos para proteína E, a confirmação da presença do mesmo também foi realizada por PCR. A Figura 11 representa os amplificadores obtidos após a utilização de iniciadores específicos para os vetores de expressão clonados com os insertos de interesse. Foram observadas bandas que variam de 480pb a 700pb (Coluna 4 da Tabela 6).

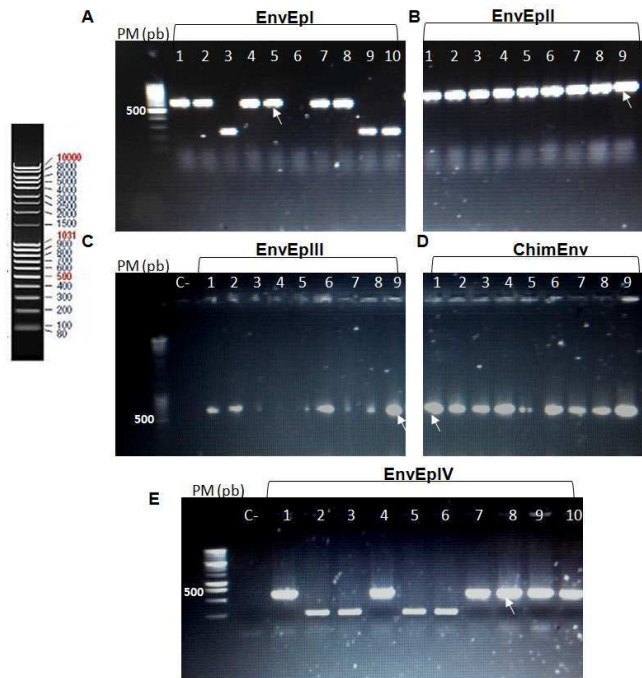


Figura 11: Confirmação da presença de inserto que codificam para proteínas quiméricas que contém epítomos para E por PCR. As culturas dos clones bacterianos da linhagem BL21 transformados com as construções plasmidiais pET-21-EnvEpl (A), pET-21-EnvEpll (B), pET-21-EnvEplll (C), pET-21-EnvEplv (E) e ChimEnv (D) foram submetidas a PCR para a verificação da presença do inserto que codificam para cada uma das proteínas quiméricas. Os números 1 a 10 representam cada colônia selecionada. As colônias indicadas com uma seta vermelha foram selecionadas para continuação dos experimentos. PM: padrão de peso molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix 80 – 10000 pb.

Outra metodologia que utilizada para confirmar a correta inserção dos insertos nos vetores de expressão e verificar a presença alguma mutação nas suas respectivas sequências, foi o sequenciamento automático de DNA com iniciadores específicos (Tabela 3).

O alinhamento utilizando-se o servidor Multalin, mostrou que os minigenes foram corretamente inseridos e que não havia ocorrido mutações.

5.2 Produção das proteínas quiméricas

As proteínas quiméricas, utilizadas neste estudo, foram produzidas em sistema procaríoto utilizando-se a bactéria *E.coli*, linhagem BL21 ou M15, transformadas com os vetores de expressão pQE-9, pET 28 TEV ou pET-21 contendo os minigenes, que codificam para as proteínas de interesse sendo a indução da expressão proteica feita pela adição de IPTG.

A Figura 12 mostra um gel representativo da expressão da proteína quimérica qDV, utilizando dois vetores de expressão diferentes: o pQE-9 e o pET 28 TEV. Na Figura 12A, observa-se a expressão de uma proteína de aproximadamente 53 KDa (seta branca) correspondente a 50 KDa da proteína quimérica qDV, contendo uma cauda composta por seis resíduos de histidina em sua porção C-terminal, quando bactérias da linhagem M15 foram transformadas com o plasmídeo pQE-9-qDV. Da mesma forma, na Figura 12B, nota-se a expressão de uma proteína com aproximadamente 53 KDa referente proteína quimérica qDV contendo uma cauda composta por seis resíduos de histidina em sua porção N e C- terminal, quando bactérias da linhagem BL21 foram transformadas com o plasmídeo pET 28 TEV-qDV.

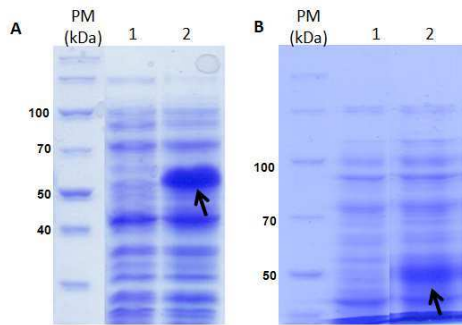


Figura 12: Verificação da expressão da proteína quimérica qDV. Estão mostrados geis representativos de eletroforese em gel SDS-PAGE dos lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem M15 e BL21 transformados, respectivamente, com os vetores de expressão pQE-9 (A) e pET 28 TEV (B) contendo o inserto que codifica a proteína qDV foram induzidos com 0,75 mM de IPTG por 4 horas. Os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% corado com Coomassie Blue. Em A e B, a canaleta 1 representa os controles não induzidos por IPTG, enquanto que a canaleta 2 representa a expressão da proteína qDV (setas pretas) após indução com IPTG. PM: Padrão de Peso Molecular (PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder).

A Figura 13 mostra um gel representativo das expressões das proteínas NS1EpI, NS1EpII, NS1EpIII, NS1EpIV, ChimNS1, EnvEpI, EnvEpII, EnvEpIII, EnvEpIV e ChimEnv em pET-21 onde são observadas bandas que variam de 13 KDa a 21 KDa (Tabela 2 – página 43), resultante do tamanho de cada proteína quimérica produzida contendo uma cauda composta por seis resíduos de histidina em sua porção C-terminal.

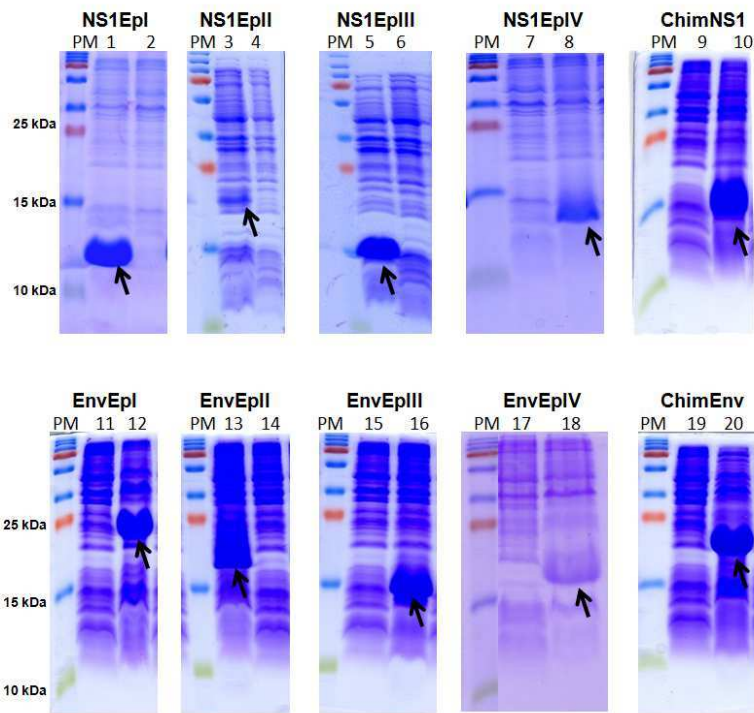


Figura 13: Verificação da expressão das proteínas quiméricas NS1Epl, NS1EplII, NS1EplIII, NS1EplIV, ChimNS1, EnvEpl, EnvEplII, EnvEplIII, EnvEplIV, ChimEnv. Estão mostrados géis representativos de eletroforese em gel SDS-PAGE dos lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem BL21 transformados com o vetor de expressão pET-21, contendo o inserto que codificam as proteínas quiméricas, que foram induzidos com 0,75 mM de IPTG por 4 horas. Os respectivos lisados bacterianos foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE a 20%, corado com Coomassie Blue. As canaletas 2, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 17 e 19 representam os controles não induzidos por IPTG, enquanto as canaletas 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 16, 18 e 20 representam a expressão de cada proteína quimérica (setas pretas) após indução com IPTG. PM: Padrão de Peso Molecular (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder).

A Figura 14 demonstra a purificação realizada por cromatografia de afinidade, em resina de níquel, das 11 proteínas quiméricas utilizadas no estudo. Tamanhos diferentes das proteínas quiméricas que variam de 13 kDa (NS1Epl) a 50 kDa (qDV) foram visualizados como esperado (Tabela 2 – página 43). Observa-se que algumas das proteínas apresentaram uma maior pureza e quantidade (NS1Epl, NS1EplIII) do que outras (EnvEpl, ChimNS1).

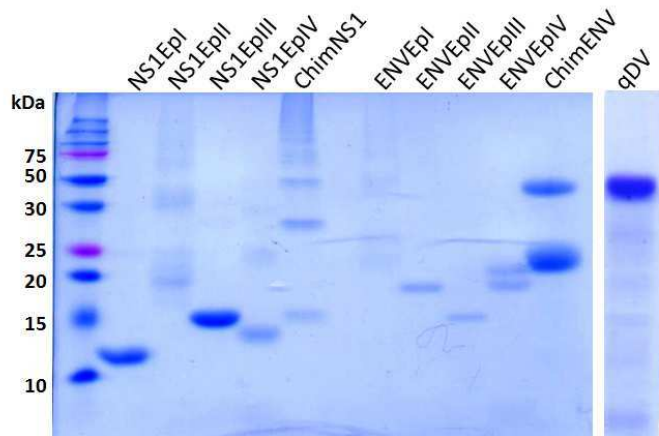


Figura 14: Gel representativo das 11 proteínas quiméricas purificadas por cromatografia de afinidade em resina de níquel. O precipitado de culturas bacterianas induzidas por IPTG para a produção de proteínas quiméricas foi lisado, clarificado e adicionado à coluna de níquel. Este gel representa a eluição das proteínas utilizando um tampão de Uréia com pH 4,5 e podemos observar bandas que variam de 13 a 50 kDa, referente aos diferentes tamanhos de cada proteína. A análise da purificação das proteínas quiméricas foi feita em SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue. Padrão de peso molecular: Precision Plus Protein Dual Color Standards.

5.3 Testes de reatividade das proteínas quiméricas com soros de pacientes infectados e não infectados por DENV

5.3.1 Western blot

A fim de testarmos a reatividade das proteínas quiméricas contra anticorpos presentes em soros de indivíduos infectados pelo DENV e de indivíduos saudáveis nunca infectados, foram feitos ensaios de Western Blot com soros disponibilizados pela Fundação Ezequiel Dias e pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Tabela 4 – página 54).

A Figura 15 representa uma membrana de nitrocelulose revelada com NBT/BCIP contendo 10 ug da proteína qDV após incubação com soros de pacientes que já foram infectados pelo DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4. Como controle negativo utilizamos soros de indivíduos nunca infectados. A proteína quimérica foi reconhecida pelos anticorpos, tanto IgM quanto IgG, presentes nos soros de pacientes já infectados pelo DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4. Entretanto, soros de indivíduos nunca infectados pelo DENV, também foram capazes de reconhecer de maneira mais fraca a proteína qDV.

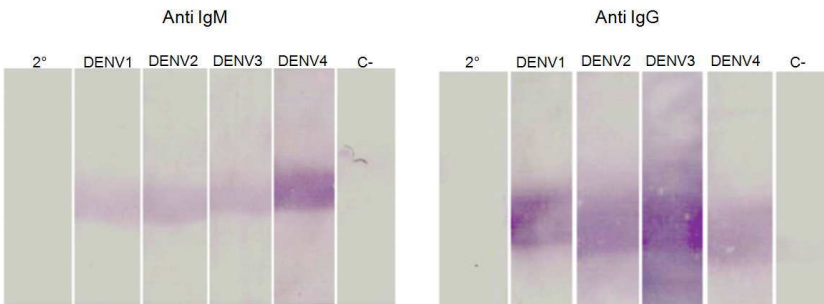


Figura 15: Ensaio de Western blot para análise da reatividade da proteína qDV com anticorpos presentes em soros de pacientes infectados e não infectados pelo DENV.

A membrana mostrada acima contendo 10ug da proteína qDV foi incubada com soros de pacientes infectados pelo DENV1-4 e nota-se que os anticorpos presentes nos soros dos pacientes infectados foram capazes e reconhecer a proteína quimérica. Como controle negativo (C-) utilizamos soro de pacientes nunca infectados. 2°: controle apenas com anticorpo secundário.

As outras dez proteínas quiméricas, NS1Epl, NS1Epll, NS1Eplll, NS1Epliv, ChimNS1, EnvEpl, EnvEpll, EnvEplll, EnvEpliv, ChimEnv, também foram submetidas a ensaios de Western blot para análise de reatividade com soros de pacientes infectados e nunca infectados. Entretanto, nenhuma delas foi reconhecida por anticorpos presentes nos soros testados (resultados não apresentados).

5.3.2 ELISA

Outro experimento realizado para testar a reatividade das proteínas quiméricas contra anticorpos presentes em soros de pacientes infectados pelo DENV e de pacientes saudáveis nunca infectados, foi o ELISA. Para isso, foram escolhidas as 5 proteínas quiméricas mais puras e obtidas em maiores quantidades (EnvEpll, EnvEplll, qDV, NS1Epl e NS1Eplll). O experimento foi feito sensibilizando-se a placa de ELISA com 100 ng/poço das proteínas quiméricas EnvEpll, EnvEplll, qDV e com 200 ng/poço das proteínas NS1Epl e NS1Eplll.

Primeiramente, testamos as proteínas com um pool de soros positivos de indivíduos sabidamente infectados por algum sorotipo do DENV (Tabela 4 – página 54). Como controle negativo, utilizamos o soro de um indivíduo nunca infectado com DENV. Além disso, foi utilizada a proteína E inteira do DENV-1 como controle do experimento, indicado no gráfico como “Controle”. A Figura 16 mostra que todas as 5 proteínas foram reconhecidas por anticorpos presentes em soros de pacientes infectados com DENV, sendo que as proteínas EnvEpl, EnvEplll e qDV apresentaram uma maior reatividade ao serem comparadas com as proteínas NS1Epl e NS1Eplll.

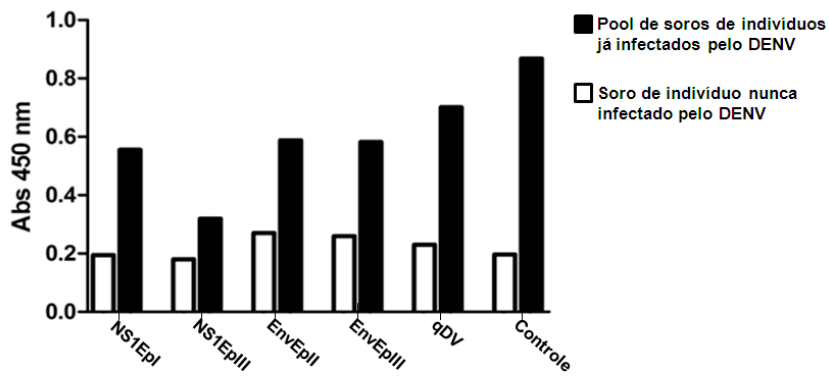


Figura 16: Ensaio de ELISA para análise da reatividade das proteínas NS1Epl, NS1EplII, EnvEplI, EnvEplII e qDV com anticorpos presentes em soros de indivíduos infectados e não infectados pelo DENV.

Leitura da densidade óptica a 450 nm do reconhecimento das proteínas NS1Epl, NS1EplII, EnvEplI, EnvEplII e qDV por pool de soros de pacientes já infectados pelo DENV e de pacientes nunca infectados através do ensaio imunoenzimático ELISA.

Para análise da reatividade das proteínas quiméricas com soros específicos para o DENV-1, DENV-2 e DENV-3, optamos por testar as que apresentaram uma maior reatividade com o pool de soros positivos, a saber: proteínas EnvEpl, EnvEplII e qDV. Para isso foram utilizados 2 soros de indivíduos que já foram infectados pelo DENV-1, 2 soros de indivíduos infectados pelo DENV-2, 1 soro de um indivíduo infectado pelo DENV-3 e um soro de um indivíduo que já foi infectado pelos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

A figura 17 mostra que as proteínas EnvEplII e EnvEplIII apresentaram uma maior reatividade para os soros de indivíduos já infectados pelo DENV-1 (Figura 17 A e B, respectivamente), enquanto que a qDV apresentou uma maior reatividade para o soro do indivíduo já infectado pelos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Figura 17C). Enquanto que para os soros de pacientes infectados pelo DENV-2 e 3, a reatividade foi baixa para todas as proteínas testadas.

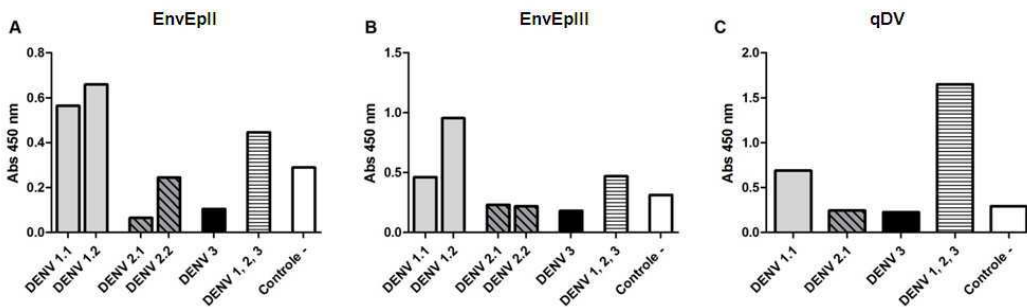


Figura 17: Análise da reatividade das proteínas EnvEplII, EnvEplIII e qDV com soros de pacientes infectados pelo DENV 1, 2 e/ou 3 por ELISA. Leitura da densidade óptica a 450 nm do reconhecimento das proteínas EnvEplII (A), EnvEplIII (B) e qDV (C) por soros de indivíduos infectados pelo DENV e de indivíduos nunca infectados através do ensaio imunoenzimático ELISA. DENV 1.1 e DENV 1.2: indivíduos que já foram infectados pelo DENV-1. DENV 2.1 e DENV 2.2: indivíduos que já foram infectados pelo DENV-2. DENV-3: indivíduo que já foi infectado pelo DENV-3. DENV 1, 2, 3: indivíduo que já foi infectado pelos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Controle -: indivíduo nunca infectado.

5.4 Avaliação da resposta humoral de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEPII

5.4.1 ELISA

Com o objetivo de avaliar a capacidade de ativar células B através da produção de anticorpos induzida pela proteína quimérica EnvEPII, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram imunizados de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.2 de Material e Métodos. Para isso, as amostras de soro coletadas 37 dias após a primeira imunização foram utilizadas para realização de ensaios de ELISA, para detecção dos anticorpos IgG_{Total}, IgG₁, IgG_{2c} e IgG_{2a}.

A Figura 18 mostra os resultados obtidos após a imunização de camundongos da linhagem BALB/c. Os títulos dos anticorpos IgG_{Total} (Figura 18A), IgG₁ (Figura 18B) e IgG_{2a} (Figura 18C) dos dois grupos que foram imunizados com a proteína EnvEPII, associada ou não ao adjuvante Alúmem, foram significativamente maiores quando comparados aos grupos controle PBS e Alúmem ($p \leq 0,001$).

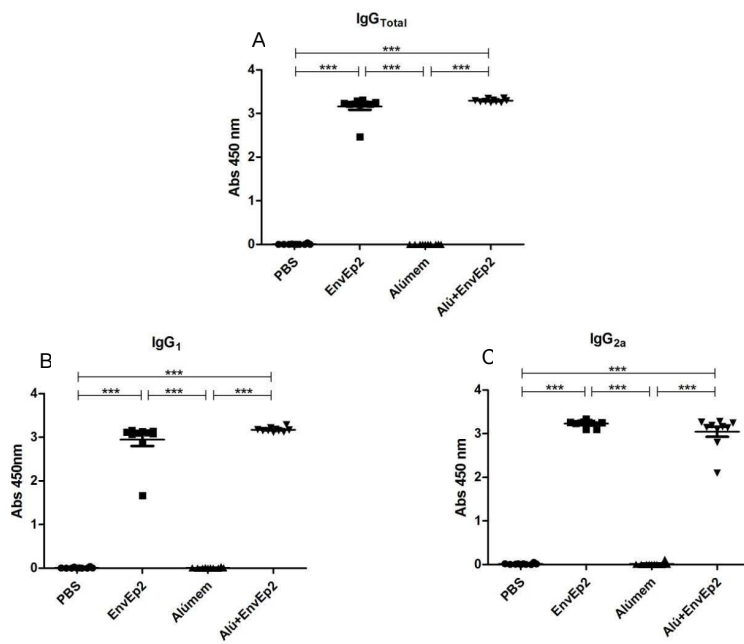


Figura 18: Avaliação da resposta humoral de camundongos BALB/c imunizados com a proteína EnvEPII.

Gráficos dos valores de absorbância apresentados pelas amostras de soro dos camundongos BALB/c 37 dias após a primeira imunização, mostrando a produção de anticorpos IgG_{Total} (A), IgG₁ (B) e IgG_{2a} (C) nos quatro grupos: PBS: animais imunizados com PBS; EnvEPII: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEPII diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alumem+EnvEPII: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEPII. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). ***, $p \leq 0,001$.

Os dados da Figura 19 mostram os resultados da produção dos anticorpos IgG_{Total} (Figura 19A), IgG₁ (Figura 19B) e IgG_{2c} (Figura 19C) após a imunização de camundongos da linhagem C57BL/6.

A reatividade dos anticorpos IgG_{Total} e IgG_{2c} contra a proteína EnvE_{PII}, foi expressa em absorbância na Figura 19A e C, respectivamente. Novamente, foi observado que os dois grupos que foram imunizados com a proteína EnvE_{PII}, associada ou não ao adjuvante Alúmem, apresentaram uma produção de anticorpos significativamente maior quando comparado aos grupos controle PBS e Alúmem ($p \leq 0,001$).

A avaliação dos dados de IgG₁ mostrou um aumento significativo da média dos valores de densidade óptica deste anticorpo em animais que foram imunizados com a proteína EnvE_{PII} associada ao adjuvante (Grupo Alú+EnvE_{PII}) quando comparado aos grupos PBS, Alúmen e EnvE_{PII} ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,01$, respectivamente).

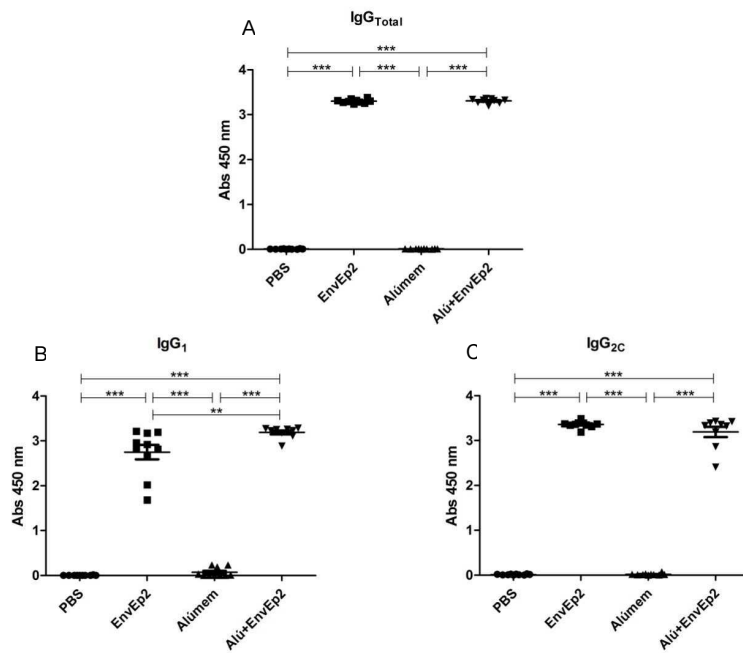


Figura 19: Avaliação da resposta humoral de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEPII. Gráficos dos valores de absorbância apresentados pelas amostras de soro dos camundongos C57BL/6 37 dias após a primeira imunização, mostrando a produção de anticorpos IgG_{Total} (A), IgG₁ (B) e IgG_{2c} (C) nos quatro grupos: PBS: animais imunizados com PBS 1X; EnvEPII: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEPII diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alumem+EnvEPII: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEPII. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). ***, p<0,001; **, p<0,01.

5.4.2 Ensaio de soroneutralização

Para análise da produção de anticorpos neutralizantes anti-DENV produzidos pelos camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados, foi realizado o ensaio de soroneutralização com o pool de soros coletados 37 dias após a primeira imunização dos diferentes grupos avaliados. Para isso, as amostras de soro de cada grupo foi diluída serialmente de 1:10 a 1:160 e cada diluição testada contra o DENV-3.

A Figura 20 demonstra a formação de placas causadas pelo DENV-3 em células BHK-21.

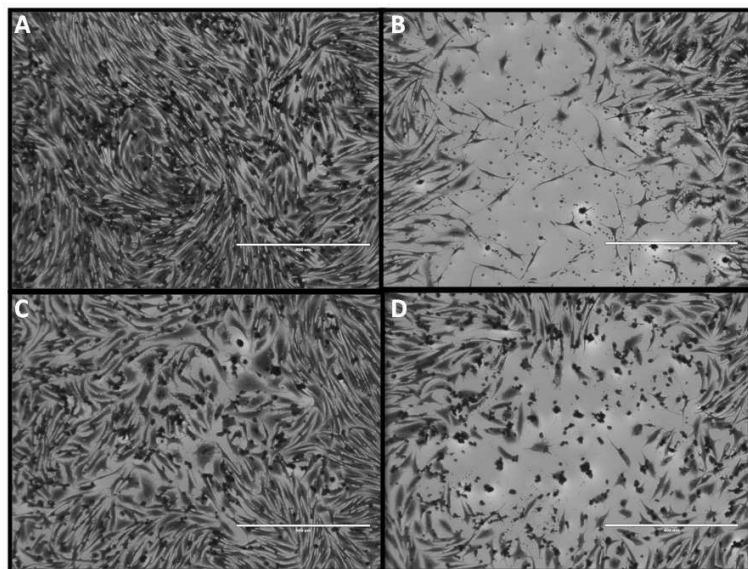


Figura 20: Efeito citopático do DENV-3 em células BHK-21 verificado em um ensaio de soroneutralização

A: Células BHK-21 com aproximadamente 90% de confluência foram utilizadas como controle de células sem infecção pelo DENV-3. B: Células BHK-21 adicionadas de aproximadamente 50 pfu do DENV-3 foram utilizadas como o controle de vírus. C: Início da formação de placas causadas pelo DENV-3 em poços que já possuíam as amostras de soro diluídas. D: Placas formadas em poços que já possuíam as amostras de soro diluídas. Aumento de 40X.

A Figura 21 mostra os resultados dos ensaios de soroneutralização do pool de soros coletados de camundongos da linhagem C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEPII associada ao adjuvante Alúmem. A presença de anticorpos neutralizantes foi determinada a partir da diluição em que houve, pelo menos, 50% de redução o número de placas de lise (soroneutralização de 50%, PRNT₅₀) quando comparada ao controle de vírus. Na diluição de 1:10 foi observada uma redução de 54% no número de placas quando comparado ao controle de vírus. Com relação aos outros grupos da linhagem C57BL/6 e aos animais da linhagem BALB/c não foi observada redução do número de placas de lise após incubação com o soro dos animais, ou, na maioria deles, houve destruição total da monocamada de células pelo vírus.

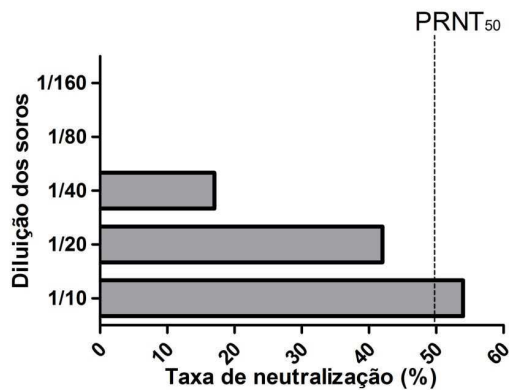


Figura 21: Ensaio de soroneutralização para análise da presença de anticorpos neutralizantes anti-DENV-3 em pool de soros de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEPII associada ao Alúmem.

O ensaio de soroneutralização foi realizado com diferentes diluições do pool de soros de camundongos imunizados com a proteína EnvEPII e a presença de anticorpos neutralizantes foi determinada a partir da diluição em que houve, pelo menos, 50% de redução na infecção (soroneutralização de 50%, PRNT₅₀) quando comparado ao controle de vírus.

5.5 Avaliação da resposta celular de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEplI

Os esplenócitos dos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram coletados 49 dias após a primeira imunização para análise da resposta celular através de imunofenotipagem por citometria de fluxo. A expressão de marcadores de superfície celular presentes nas células dos camundongos imunizados foi avaliada após cultura não estimulada e estimulada pela proteína EnvEplI nos tempos 6 h, 16 h e 24 h. Como nenhuma diferença foi observada após estimulação antigênica específica, optou-se por mostrar os resultados apenas da cultura não estimulada.

A Figura 22 mostra o número de linfócitos TCD3⁺ (marcador de linfócito T) por valor absoluto (total de leucócitos x percentual- mm³), nos diferentes tempos de cultura 6 h, 16 h e 24 h em camundongos BALB/c. Os dados mostram que após 16 h de cultura (Figura 22B), o número de células CD3⁺ por mm³ do grupo de camundongos que foi imunizado com a proteína EnvEplI associada ao adjuvante Alúmem foi significativamente maior comparado aos outros três grupos de animais ($p \leq 0,001$). Observamos também que no tempo de 16 h, o grupo Alúmem apresentou maior expressão dessas células do que o grupo controle PBS ($p \leq 0,05$). Nos tempos 6 h e 24 h (Figura 22A e 22C) não houve diferença estatística no valor absoluto dessas populações de células CD3⁺ em camundongos BALB/c.

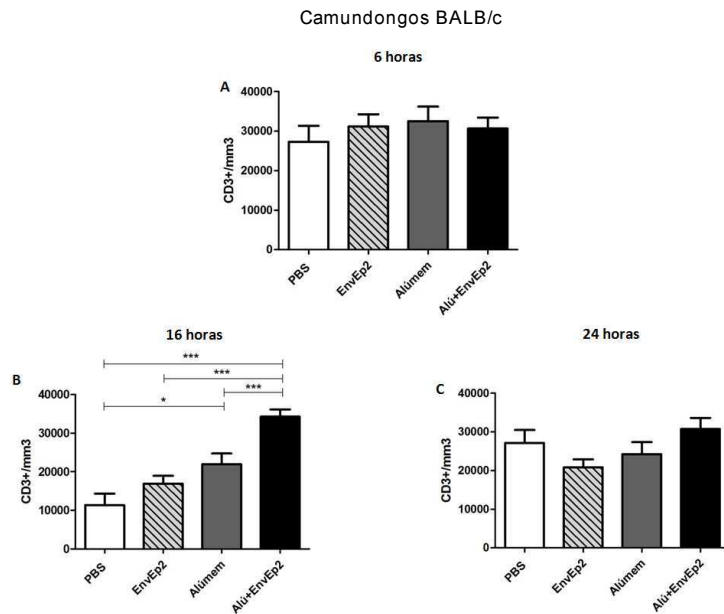


Figura 22: Valor absoluto de células CD3⁺ (mm³) após 6h, 16h e 24h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD3⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6 h, B: 16 h e C: 24 h a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alum+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

O perfil de expressão da molécula CD3⁺ em camundongos C57BL/6 também foi avaliado. A Figura 23 A, B e C representa o número de células CD3⁺ por mm³ após diferentes tempos de cultura, 6 h, 16 h e 24 h (A, B e C, respectivamente). Não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos quando avaliados 6h, 16h 24h de cultura de esplenócitos.

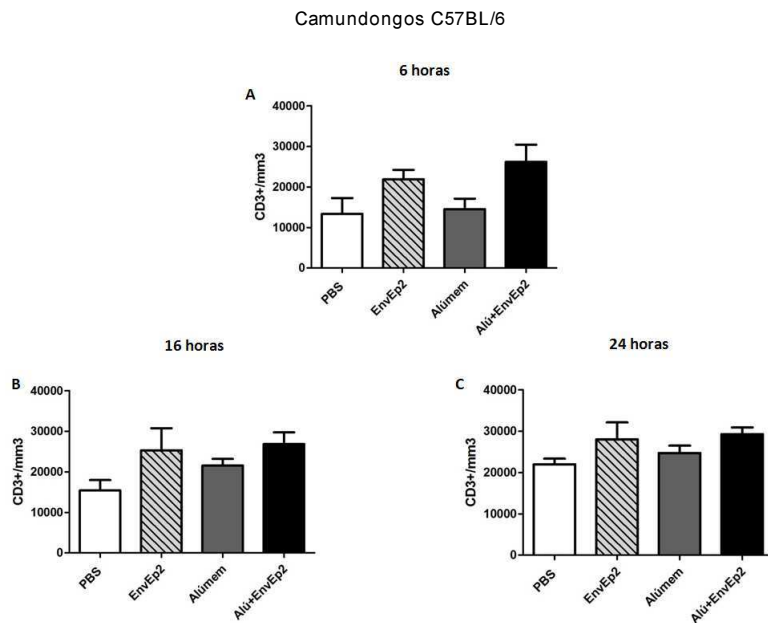


Figura 23: Valor absoluto de células CD3⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpII.

O valor absoluto de células CD3⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6 h, B: 16 h e C: 24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS 1X; EnvEpII: animais imunizados com 10 µg da proteína quimérica EnvEpII diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS 1X; Alum+EnvEpII: animais imunizados com Alumem e 10 µg da proteína EnvEpII. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A avaliação do perfil de células T auxiliares foi realizada pelos marcadores da subpopulação de CD3⁺. Para isso, a expressão de CD4⁺ foi avaliada e os dados obtidos em experimentos utilizando camundongos BALB/c estão representados na Figura 24. No tempo de 16 h (Figura 24B) foi observado que o grupo de animais imunizado com a proteína EnvEplI associada ao adjuvante Alúmem, apresentou um número de células CD3⁺CD4⁺ significativamente maior quando comparado ao grupo controle PBS ($p \leq 0,001$), grupo EnvEplI ($p \leq 0,001$) ou grupo Alúmem ($p \leq 0,001$). Além disso, animais do grupo Alúmem apresentaram número significativamente maior de células CD3⁺CD4⁺ do que o grupo PBS ($p \leq 0,05$).

Com relação aos tempos de cultura 6 h e 24 h, que estão representados na Figura 24A e C, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos de estudo em relação ao número de células CD3⁺CD4⁺/mm³.

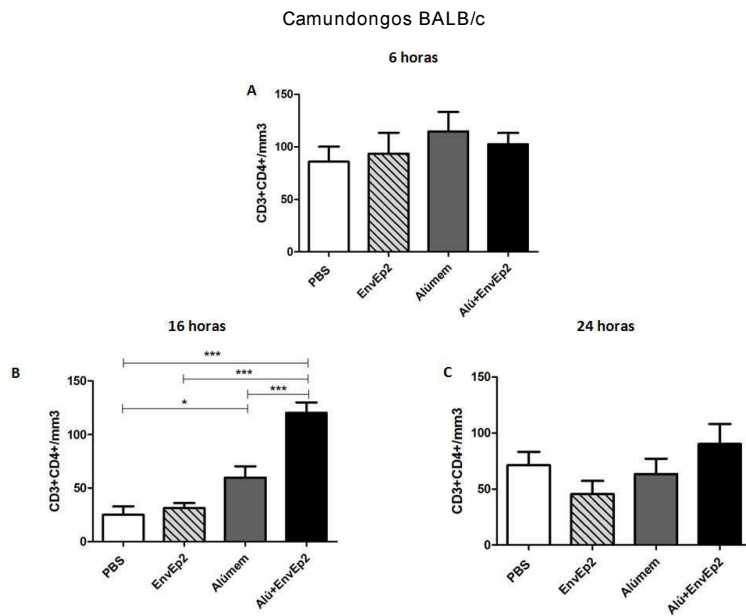


Figura 24: Valor absoluto de células CD3⁺CD4⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD3⁺CD4⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6h, B:16h, C:24h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alum+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A subpopulação de linfócitos T CD4⁺ também foi avaliada em camundongos C57BL/6 após a imunização com a proteína quimérica EnvEplI. Nenhuma diferença significativa foi observada no número de células CD3⁺CD4⁺ /mm³ nos grupos avaliados, independente do tempo de cultura (Figura 25).

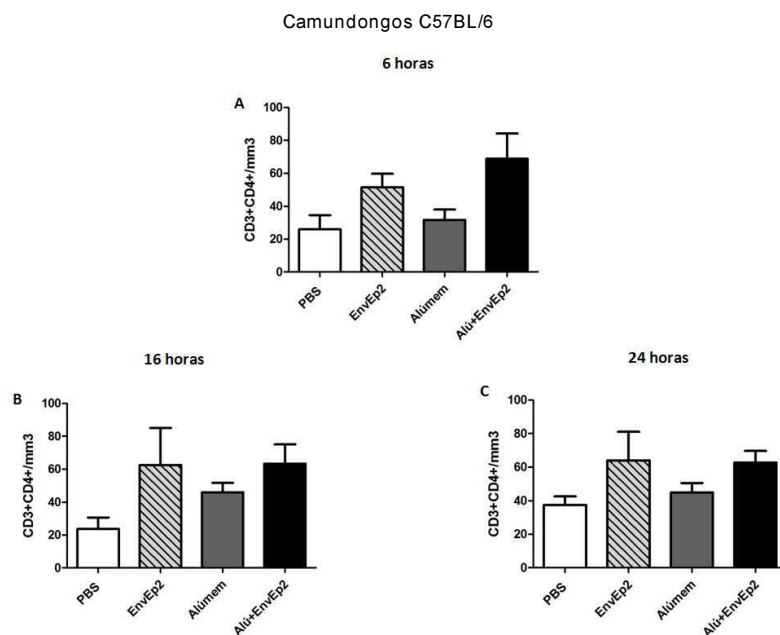


Figura 25: Valor absoluto de células CD3⁺CD4⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD3⁺CD4⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6h, B:16h, C:24h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alú+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A população de linfócitos T citotóxicos foi avaliada através da expressão de CD8⁺ após a imunização de camundongos BALB/c e está representada na Figura 26. Após 16 h de cultura, foi observado um maior número de linfócitos T CD8⁺ em animais imunizados com a proteína EnvE_{PII} associada ao adjuvante Alúmen, quando comparado aos grupos PBS, Alúmen e EnvE_{PII} ($p \leq 0,001$). Além disso, o grupo Alúmen apresentou número significativamente maior de células CD3⁺CD8⁺ quando comparado ao grupo controle PBS ($p \leq 0,05$).

Com relação aos tempos de cultura 6 h e 24 h, que estão representados na Figura 26A e C, nenhuma diferença estatística no número de células CD3⁺CD8⁺/mm³ foi observada entre os grupos de estudo.

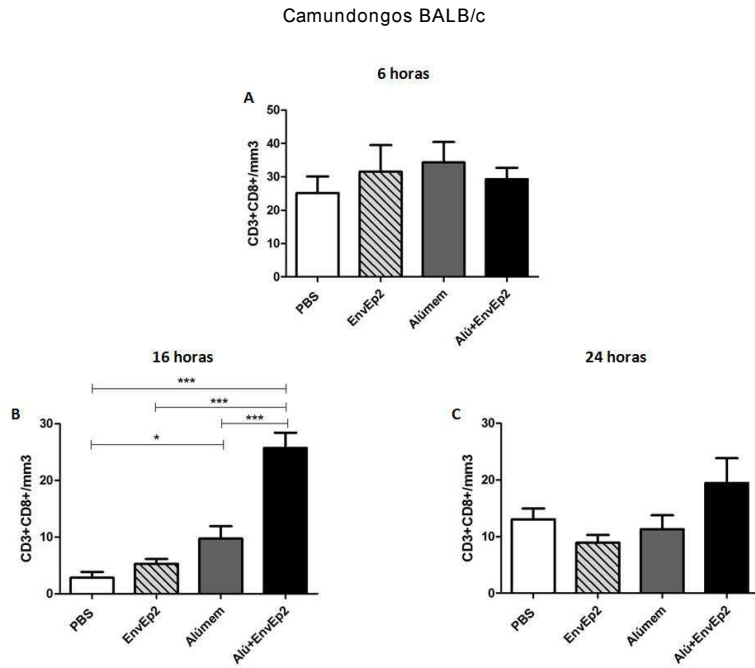


Figura 26: Valor absoluto de células CD3⁺CD8⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD3⁺CD8⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6 h, B:16 h, C:24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alúmem: animais imunizados com Alúmem diluído em PBS; Alú+EnvEplI: animais imunizados com Alúmem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A Figura 27 mostra o perfil do marcador de linfócitos T citotóxicos, CD8⁺, em camundongos da linhagem C57BL/6 imunizados. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os números de células CD3⁺CD8⁺ por mm³ após 6 h, 16 h e 24h de cultura, em nenhum dos grupos de estudo.

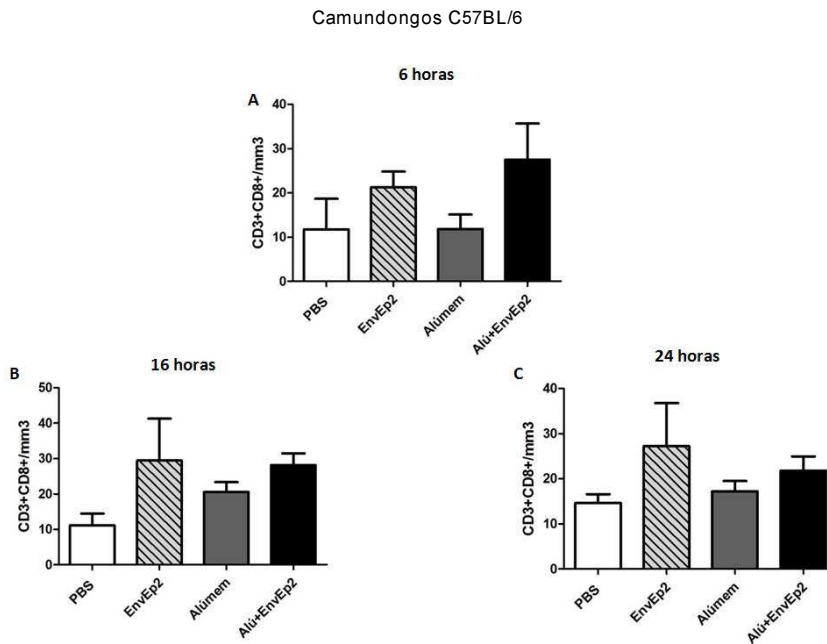


Figura 27: Valor absoluto de células CD3⁺CD8⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEpII.

O valor absoluto de células CD3⁺CD8⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A: 6 h, B:16 h, C:24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEpII: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEpII diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alum+EnvEpII: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEpII. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

O perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pela expressão do marcador celular CD25⁺ também foi avaliado. A Figura 28 representa os resultados obtidos em camundongos BALB/c. Os dados mostram que não houve diferença significativa no valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺ e CD8⁺CD25⁺ entre os grupos avaliados, após 6 h de cultura (Figura 28 A e B).

A Figura 28 C e D mostra o número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, após 16 h em cultura. Não houve diferença significativa no número de células CD4⁺CD25⁺ entre os grupos de estudo (Figura 28C). Entretanto, a avaliação de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ apresentou número de células estatisticamente maior no grupo Alú+EnvEplI quando comparado ao grupo PBS ($p \leq 0,05$). Em relação aos outros grupos EnvEplI e Alúmen, não foi observada nenhuma diferença estatística (Figura 28D).

A Figura 28 E e F mostra o número de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, respectivamente, 24 h após cultura. Em relação ao valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺, não foi observado diferença significativa entre os grupos (Figura 28 E). A análise do número de células CD8⁺CD25⁺ se apresentou significativamente maior no grupo Alú+EnvEplI comparado ao grupo Alúmen ($p \leq 0,05$) [Figura 28F].

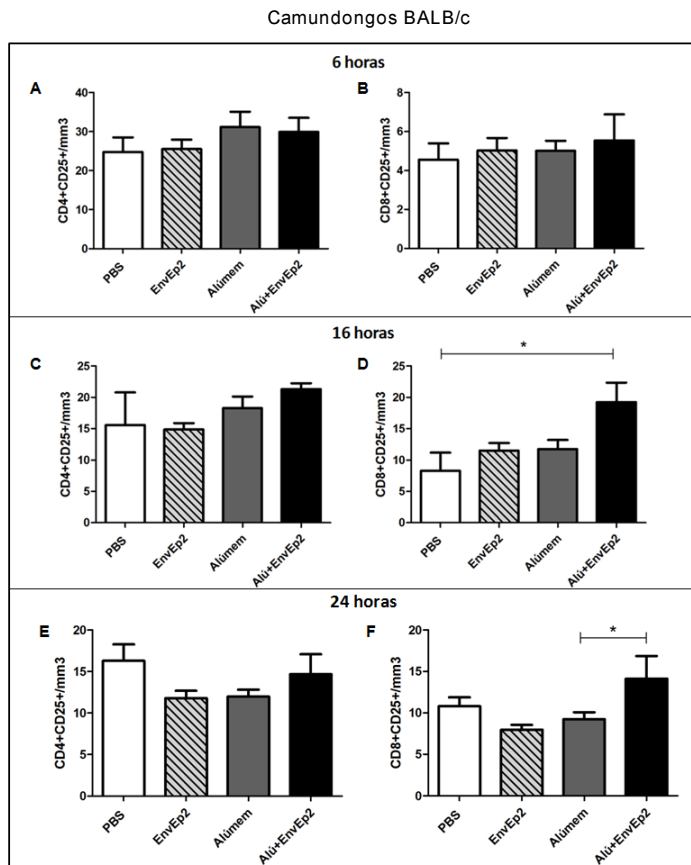


Figura 28: Valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A e B: 6 h, B e C: 16 h, E e F :24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alumem+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A análise do perfil de ativação celular em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ também foi realizada em animais C57BL/6 através da expressão de CD25. A Figura 29 representa os dados obtidos após a imunização de camundongos, nos tempos 6 (A e B), 16 (C e D) e 24 (E e F) horas de cultura. Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao perfil de ativação de linfócitos T CD8⁺ entre os grupos e tempos de cultura avaliados.

Com relação à avaliação de células T CD4⁺CD25⁺ observou-se maior expressão desses marcadores em células de camundongos que receberam a proteína quimérica EnvEPII associada ao adjuvante Alúmen quando comparado aos animais do grupo controle PBS no tempo de 16 h ($p \leq 0,05$) [Figura 29C].

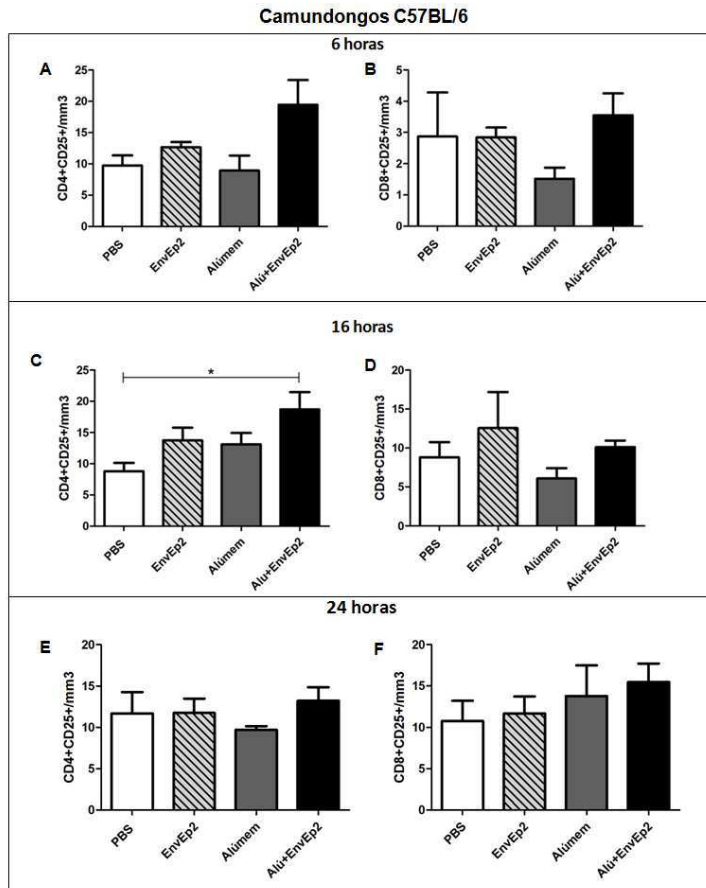


Figura 29: Valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A e B: 6 h, B e C: 16 h, E e F: 24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 ug da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alú+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 ug da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A expressão de CD74, receptor do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), foi avaliada em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, nos tempos 6, 16 e 24 horas, em animais BALB/c e C57BL/6 (Figuras 30 e 31).

A Figura 30 representa os resultados obtidos após cultura de esplenócitos de animais BALB/c nos tempos 6, 16 e 24 h. Nenhuma diferença significativa entre os grupos em relação ao valor absoluto de células CD4⁺CD74⁺ e CD8⁺CD74⁺ nos tempos de cultura 6h e 24h (Figura 30A, B, E e F) foi observada. Quando avaliado o tempo de 16 h de cultura celular, foi verificada expressão significativamente maior de células CD4⁺CD74⁺ pelo grupo Alú+EnvEplI quando comparado aos grupos PBS ($p \leq 0,001$), EnvEplI ($p \leq 0,001$) e Alúmem ($p \leq 0,05$) [Figura 30 C].

Em relação ao valor absoluto de células CD8⁺CD74⁺, foi observada diferença significativamente maior em animais do grupo Alú+EnvEplI comparado ao grupo PBS ($p \leq 0,05$) [Figura 30D]. Não foi observada diferença estatística em relação aos outros grupos.

Camundongos BALB/c

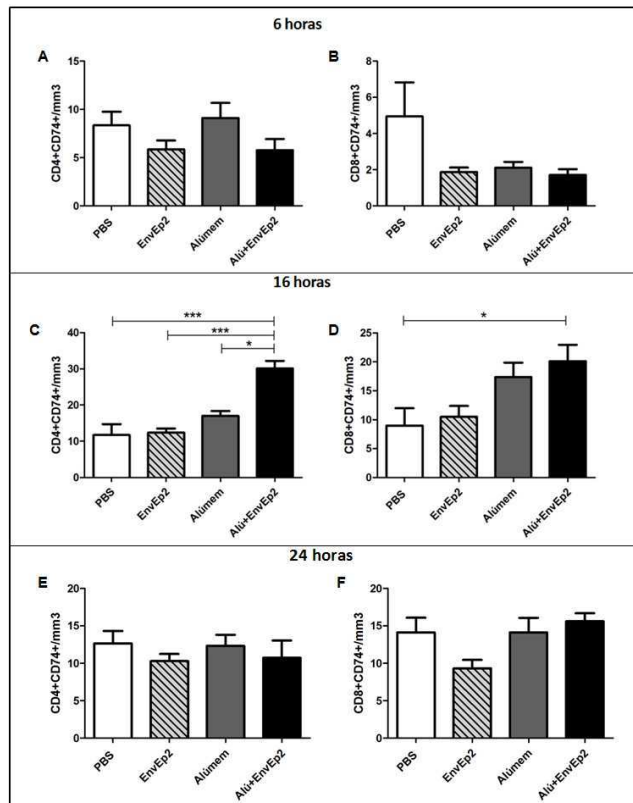


Figura 30: Valor absoluto de células CD4⁺CD74⁺, CD8⁺CD74⁺ (mm³) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína quimérica EnvEpiI.

O valor absoluto de células CD4⁺CD74⁺, CD8⁺CD74⁺ (mm³) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A e B: 6 h, C e D: 16 h, E e F: 24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEpiI: animais imunizados com 10 µg da proteína quimérica EnvEpiI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alu+EnvEpiI: animais imunizados com Alumem e 10 µg da proteína EnvEpiI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

A expressão de CD74 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ também foi avaliada em camundongos da linhagem C57BL/6 imunizados com a proteína EnvE_{PII}, associada ou não ao adjuvante Alúmen, comparado ao grupo controle (PBS) (Figura 31).

A Figura 31 A e B mostra, respectivamente, o número de células CD4⁺CD74⁺ e CD8⁺CD74⁺ observado após 6 h de cultura. Não houve diferença estatística no valor absoluto de células CD4⁺CD74⁺ entre os grupos estudados (Figura 31A). A Figura 31B mostra os dados obtidos com relação às células CD8⁺CD74⁺ onde observou-se um número significativamente maior destas células no grupo Alú+EnvE_{PII} comparado com o grupo Alúmem ($p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa quando comparado aos grupos PBS e EnvE_{PII}.

A Figura 31 C e D representa os resultados obtidos após 16h de cultura, enquanto a figura 31 E e F representam aqueles obtidos 24 horas após cultura. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à expressão de CD74 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre os grupos de estudo.

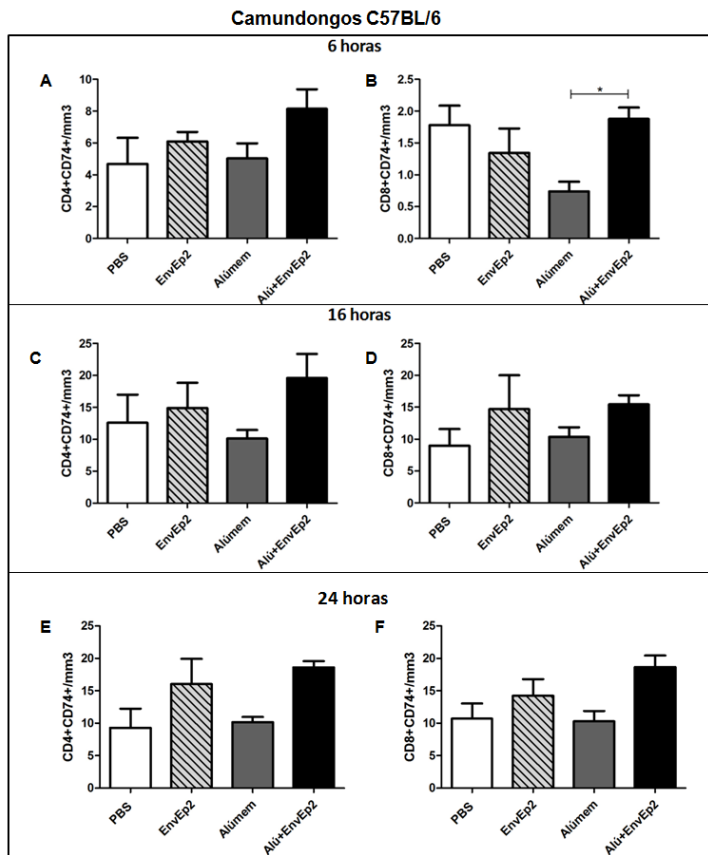


Figura 31: Valor absoluto de células $CD4^+CD74^+$, $CD8^+CD74^+$ (mm^3) após 6 h, 16 h e 24 h de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica EnvEplI.

O valor absoluto de células $CD4^+CD74^+$, $CD8^+CD74^+$ (mm^3) foi analisado por citometria de fluxo em três tempos de cultura diferentes: A e B: 6 h, B e C: 16 h, E e F: 24 h, a partir de esplenócitos de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 μg da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com Alumem diluído em PBS; Alumem+EnvEplI: animais imunizados com Alumem e 10 μg da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.6 Avaliação do padrão de citocinas

Os níveis de citocinas do sobrenadante de cultura de esplenócitos após 24 horas de cultura de células, na presença ou ausência de estimulação antigênica específica pela proteína EnvE_{PII}, foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) [Becton Dickinson]. Os valores foram apresentados em delta de estimulação, ou seja, o valor da cultura estimulada subtraído pelo valor da cultura não estimulada.

A Figura 32 representa a produção das citocinas IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2, 24 horas após a cultura de esplenócitos. Quando avaliado o nível da citocina IL-17A em sobrenadante de cultura de células estimuladas de camundongos da linhagem BALB/c, o grupo Alú+EnvE_{PII} apresentou produção de IL-17A significativamente maior comparado aos grupos PBS, EnvE_{PII} e Alúmen ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, respectivamente) [Figura 32B]. Semelhante aos resultados de IL-17A, a avaliação dos níveis de IL-2 em sobrenadante mostrou que o grupo Alú+EnvE_{PII} apresentou níveis significativamente mais elevados desta citocina comparado aos grupos PBS, EnvE_{PII} e Alúmen ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente) [Figura 32G].

Em relação à citocina IFN- γ , o grupo EnvE_{PII} apresentou níveis significativamente mais elevados desta citocina quando comparado aos grupos PBS, Alúmem e Alú+EnvE_{PII} ($p \leq 0,05$) [Figura 32D]. A citocina IL-4 mostrou-se significativamente mais elevada nos grupos EnvE_{PII} e Alú+EnvE_{PII} comparado ao grupo Alúmem ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$, respectivamente). No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PBS (Figura 32F).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, quando avaliados os níveis de citocinas IL-10, TNF- α e IL-6 (Figura 32A, C e E, respectivamente).

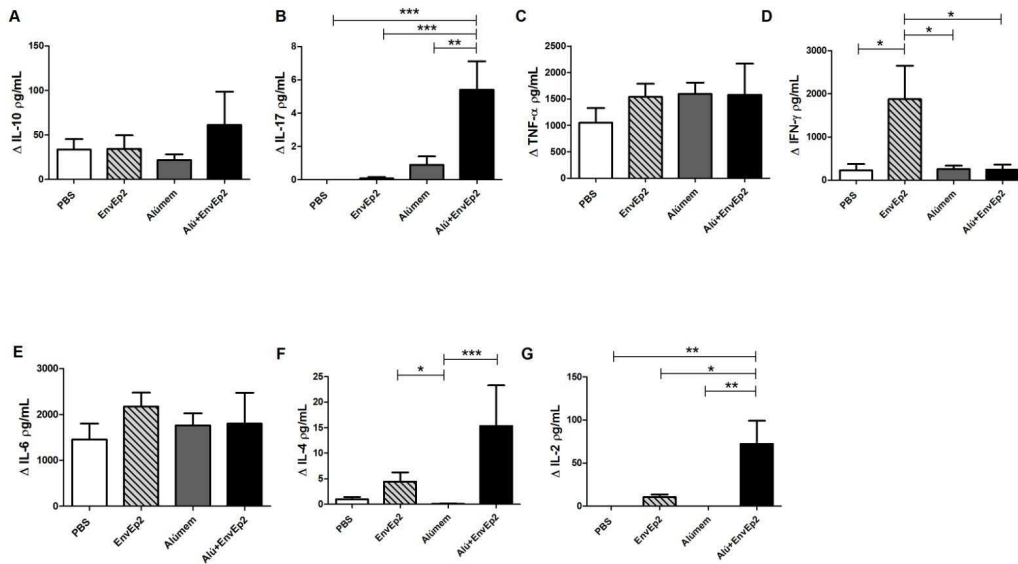


Figura 32: Análise de citocinas IL-10, IL17, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 do sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c após 24 h de estímulo com a proteína EnvEpiI.

Os níveis das citocinas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), por citometria de fluxo, a partir de sobrenadante de cultura de células de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEpiI: animais imunizados com 10 μ g da proteína quimérica EnvEpiI diluída em PBS; Alumem: animais imunizados com alumínio diluído em PBS; Alú+EnvEpiI: animais imunizados com alumínio e 10 μ g da proteína EnvEpiI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

A figura 33 representa os níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6, após 24 h de cultura. Semelhante ao observado em camundongos da linhagem BALB/c, também foram observados níveis significativamente mais elevados de IL-17A no grupo Alú+EnvEplI quando comparado aos grupos PBS ($p \leq 0,05$), EnvEplI ($p \leq 0,01$) e Alúmem ($p \leq 0,01$) [Figura 33B]. Em relação à citocina IL-2, foram observados níveis significativamente aumentados no grupo Alú+EnvEplI comparado aos grupos PBS e Alúmem ($p \leq 0,01$) (Figura 33G). Não foi observada diferença significativa dos níveis das citocinas IL-10, TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-4 (Figura 33A, C, D, E e F) nos sobrenadantes de cultura de células, estimuladas por 24h com a proteína EnvEplI, entre os grupos de animais da linhagem C57BL/6 estudados.

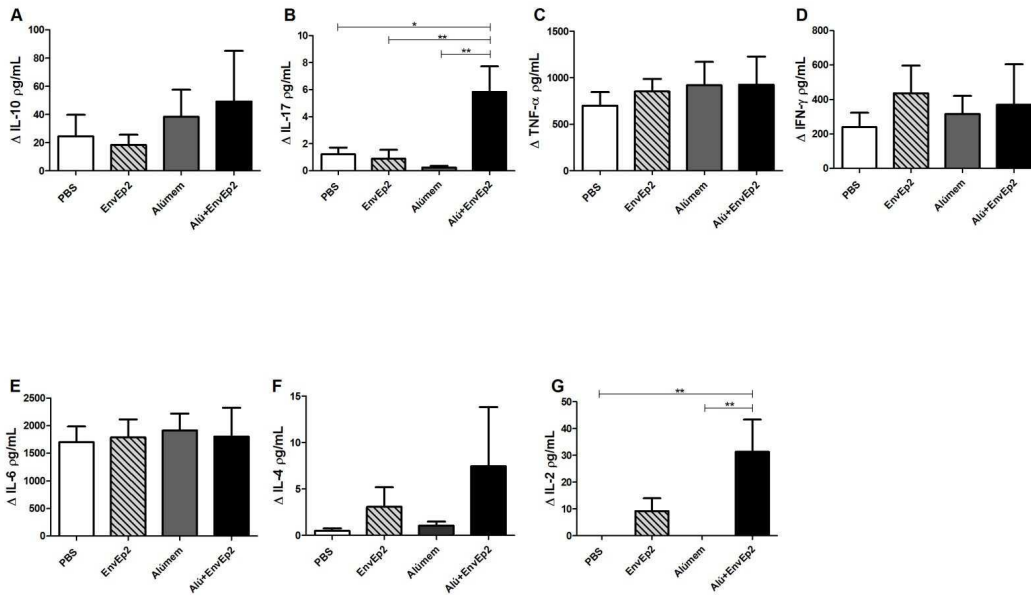


Figura 33: Análise de citocinas IL-10, IL17, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 do sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos da linhagem C57BL/6 após 24 h de estímulo com a proteína EnvEplI.

Os níveis das citocinas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), por citometria de fluxo, a partir do sobrenadante de cultura de células de camundongos dos 4 grupos estudados. PBS: animais imunizados com PBS; EnvEplI: animais imunizados com 10 μ g da proteína quimérica EnvEplI diluída em PBS; Alúmem: animais imunizados com alúmem diluído em PBS; Alú+EnvEplI: animais imunizados com alúmem e 10 μ g da proteína EnvEplI. Dados representados como média e desvio padrão da média (SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

6 DISCUSSÃO

A dengue é um problema de saúde pública mundial, com epidemias recorrentes nas regiões tropicais da Ásia, da África e das Américas. A infecção por DENV pode causar quadros clínicos bastante diversificados que vão desde uma infecção assintomática até a morte de pacientes com quadros de choque hipovolêmico (Gregson & Edelman, 2003; WHO, 2009).

A Organização Mundial da Saúde já elegeu o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue como uma de suas prioridades em razão do impacto que esta doença causa nos países afetados. Avanços biotecnológicos em diversas áreas de pesquisa têm contribuído para o desenvolvimento de formulações vacinais mais seguras e eficazes. Dessa forma, diversas vacinas candidatas já foram elaboradas, embora não haja ainda nenhuma, comprovadamente eficaz e comercialmente disponível (WHO, 2009; Yauch & Shresta, 2014).

É neste contexto que este estudo buscou uma alternativa às estratégias vacinais clássicas, através da utilização de proteínas quiméricas artificiais. Essa estratégia permite a construção de proteínas contendo epítomos sabidamente imunogênicos do DENV, que podem ser arranjados de forma a gerar uma resposta protetora equilibrada. Tais proteínas poderiam também ser utilizadas para diagnóstico laboratorial da dengue, desempenhando um papel crucial na assistência ao paciente.

Para produção das proteínas quiméricas, o primeiro passo foram as suas respectivas construções (design) utilizando-se ferramentas de bioinformática. O download de todas as sequências de genomas completos de DENV depositadas no NCBI foi realizado. Devido ao fato de que o DENV de um determinado sorotipo é filogeneticamente semelhante em uma determinada região e é altamente variável em diferentes regiões do mundo (Weaver & Vasilakis, 2009), optou-se por trabalhar apenas com sequências encontradas na América do Sul. Todos os epítomos selecionados foram separados e conectados por uma sequência de aminoácidos, denominada espaçadores. Está é uma etapa crucial para construção da proteína, já que eles são responsáveis por manter a conformação dos epítomos selecionados quando a proteína é expressa, não sendo reconhecidos como uma sequência antigênica

(Schubert & Kohlbacher, 2016). Os espaçadores utilizados normalmente são baseados no aminoácido glicina, com tamanhos que permitam uma distância mínima entre a porção C-terminal de um epítipo e a porção N-terminal do epítipo seguinte (Robinson & Sauer, 1998). Além disso, o aminoácido glicina é utilizado por não possuir cadeia lateral, permitindo a aproximação de dois peptídeos, ao seu tamanho e flexibilidade (Karp, 2005). No presente trabalho foi utilizado como espaçador uma sequência composta por resíduos de prolina e glicina, o que permitiu a produção de nossas proteínas de interesse.

A segunda etapa do projeto foi a produção das proteínas quiméricas desenhadas. Um dos sistemas utilizados foi o da *E. coli* da linhagem M15 com o vetor de expressão pQE-9 para produção da proteína qDV. A linhagem M15 possui o plasmídeo pRER4 com o gene codificador para o repressor do operon Lac presente no pQE-9. Na presença do IPTG, esse repressor é inativado e o operon Lac acionado, o que permite a transcrição e tradução dos insertos clonados no plasmídeo de expressão resultando na produção das proteínas recombinantes de interesse (Sambrook et al., 1998; Qiagen, 2003). Outro sistema utilizado foi o da *E. coli* da linhagem BL21 com os vetores pET-21 e pET-28 TEV. Neste sistema, utiliza-se o promotor e a RNA polimerase do fago T7. Em vetores de expressão T7 os genes clonados são submetidos ao controle do promotor T7, limitando assim sua transcrição. Para que a transcrição ocorra, o gene da T7 RNA polimerase deve também estar presente na célula, sob o controle de um sistema facilmente regulado pelo operon lac, que pode ser também ativado pelo IPTG (Madigan, 2010). A bactéria *E. coli* BL21 é muito utilizada com estes vetores, pois são deficientes em várias proteases, sendo capazes de expressar grande quantidade de proteínas exógenas (Sørensen & Mortensen, 2005).

O protocolo de indução da expressão proteica das culturas foi feita utilizando IPTG e a purificação das proteínas foi feita da forma desnaturante. A presença da cauda com 6 resíduos de histidina nas proteínas recombinantes produzidas possibilitou a purificação cromatográfica das proteínas de forma que fossem obtidas preparações quase puras com a presença de poucos contaminantes (Anwar et al., 2006). As diferentes proteínas quiméricas expressas apresentaram níveis de pureza e concentração variadas, sendo que todas elas apresentaram uma maior concentração nas frações da purificação

com pH mais ácido (pH=4,5). Em alguns casos foi observada, a existência de bandas inespecíficas, que não correspondem ao tamanho esperado. Nestes casos uma alternativa seria a otimização da metodologia utilizada, aumentando o número de lavagens durante a purificação proteica. No caso da proteína EnvEp1, há indícios de que ela esteja degradada, já que em outros geis de purificação (não mostrado) foi observada uma banda relativamente forte correspondente ao tamanho esperado. Nos próximos experimentos de purificação desta proteína iremos utilizar inibidores de protease na tentativa de impedir que ocorra a degradação proteica. Com relação às outras proteínas, os resultados mostram que estão puras e em concentrações satisfatórias.

Segundo Tan e colaboradores (2007), a proteína E de Flavivírus é extremamente sensível à degradação por protease no sistema E. coli de expressão. Sabe-se também que grandes proteínas tendem a ser expressas em menores quantidades (Jaiswal et al., 2004). Isso seria uma explicação para o fato das proteínas NS1 terem sido expressas em maior quantidade do que as proteínas do envelope que são maiores, entretanto, este fato não ocorreu com a produção da proteína qDV.

Quanto à reatividade das proteínas quiméricas com anticorpos IgG e IgM em soros de indivíduos que já foram infectados pelo DENV e indivíduos nunca infectados, verificamos que houve um reconhecimento específico por anticorpos presentes em soros de indivíduos que já foram infectados pelo DENV 1, 2, 3 ou 4, nos ensaios de Western Blot. Entretanto, anticorpos presentes em soros de indivíduos nunca infectados, também foram capazes de reconhecer a proteína qDV, ainda que de maneira muito mais fraca. É possível que tenha ocorrido uma resposta cruzada fraca com outras viroses da família Flaviviridae, como por exemplo, febre amarela, uma doença que grande parte da população já foi vacinada (Mansfield et al., 2011).

Com relação às outras proteínas que não foram reconhecidas por nenhum dos soros testados, faz-se necessária a realização de outros experimentos nos quais serão testadas diferentes concentrações das proteínas quiméricas e dos soros de pacientes, na tentativa de observar a reatividade entre eles.

O ensaio de ELISA foi feito para a análise da reatividade das proteínas EnvEpII, EnvEpIII, qDV, NS1EpI e NS1EpIII com soros de indivíduos já

infectados e nunca infectados pelo DENV. Os resultados mostraram que as proteínas que possuem epítomos do envelope (E) apresentaram uma maior reatividade com soros de pacientes já infectados, quando comparadas às proteínas que possuem epítomos da proteína NS1. Isso já era previsto, já que a proteína E é o maior e mais importante antígeno da superfície viral, além de ser o principal alvo de anticorpos do sistema imune do hospedeiro (Lindenbach et al., 2007; Mayhob, 2011). Este resultado sugere que as proteínas EnvEplI, EnvEplII, qDV, NS1EplI e NS1EplII são bastante promissoras para futuras utilizações como diagnóstico, já que elas apresentaram uma maior reatividade com soro de pacientes já infectados pelo DENV se comparado ao soro de pacientes nunca infectados.

Resultados preliminares deste estudo demonstraram que as proteínas EnvEplI e EnvEplII apresentaram uma maior reatividade para soros de indivíduos que já foram infectados pelo DENV-1, enquanto que a qDV apresentou uma maior reatividade para o soro de um indivíduo que já foi infectado pelos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Já com o soro de indivíduos já infectados pelos DENV-2 e DENV-3 nenhuma delas apresentou reatividade. Para comprovar tais resultados, será necessário aumentar o número de soros testados, para avaliar se tais proteínas quiméricas são reconhecidas por anticorpos gerados pela infecção de sorotipos específicos do DENV.

Para avaliação da imunogenicidade das proteínas quiméricas, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com uma delas, a EnvEplII. A princípio, optou-se por escolher apenas uma proteína, pois este experimento seria uma padronização da técnica, da linhagem de camundongo apropriada e o adjuvante que geraria uma resposta mais adequada para os objetivos traçados neste estudo. A proteína EnvEplII foi escolhida por causa do potencial imunogênico da proteína E, que além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes, é também utilizada na maior parte de vacinas que estão em fase de teste (Yauch & Shresta, 2014). Além disso, a proteína EnvEplII apresentou alta pureza e alto rendimento após purificação. A EnvEplII possui epítomos altamente imunogênicos do domínio I da proteína E preditos por ferramentas de bioinformática. Alguns estudos mostraram que anticorpos monoclonais de camundongos direcionados ao domínio II ligam-se a epítomos com reatividade cruzada entre os sorotipos e possuem baixa

capacidade de neutralização, enquanto que anticorpos que se ligam ao domínio I e III são tipo-específicos e grupo-específicos (Crill & Chang, 2004; Lai et al., 2008). Entretanto, anticorpos contra o domínio III, não neutralizantes e com reatividade cruzada entre os sorotipos já foram identificados (Sherestha et al., 2010). Estudos com soro humano indicam que anticorpos contra epítomos do domínio III contribuem para a proteção quando presentes, mas não constituem a maior parte dos anticorpos gerados e podem ser substituídos por anticorpos neutralizantes direcionados a outros epítomos fora desse domínio (Wahala et al., 2009; Williams et al., 2012).

Os experimentos foram realizados em duas linhagens distintas de camundongos, devido aos diferentes direcionamentos das respostas imunes geradas em cada uma delas. A população de células T CD4⁺ (linfócitos T auxiliares) é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2. A resposta Th1 está relacionada com reações inflamatórias mediadas por células e as principais citocinas produzidas são: IFN γ , IL-12 e TNF- β . A resposta Th2 está associada com a produção de anticorpos por células B e as principais citocinas produzidas são IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (relacionadas com resposta T reguladora) e IL-13 (Abbas, 2007). Os camundongos da linhagem BALB/c são caracterizados por gerar uma resposta Th2, já os camundongos C57BL/6 são caracterizados por gerar uma resposta Th1 (Watanabe et al., 2004). Dessa forma, seria possível analisar qual modelo animal é mais apropriado para realização de futuros experimentos de imunogenicidade utilizando proteínas quiméricas do DENV.

O alumínio foi escolhido como adjuvante, pois já foi mostrado que adjuvantes a base de alumínio são capazes de induzir uma forte resposta imune inata que consiste na produção de neutrófilos, eosinófilos, células NK, monócitos e DC no local da injeção (Kool et al., 2012). Além disso, este adjuvante induz uma resposta, predominantemente, do tipo Th2, associada à produção de anticorpos e induz a produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 em camundongos. A utilização do alumínio melhora a absorção do antígeno utilizado, sendo capaz de exacerbar a resposta imune, facilitando a fagocitose e diminuindo a difusão do antígeno, o que permite tempo hábil para células inflamatórias se acumularem no local da injeção (HogenEsch, 2014). Além disso, diversos trabalhos já demonstraram segurança do uso do alumínio como

adjuvante, com um histórico de uso de mais de 70 anos (Kendrick, 1943; Kanra et al., 1999; Wang et al., 2000; Berthold et al., 2005; Jones et al., 2005; HogenEsch, 2011; HogenEsch, 2014).

A resposta humoral induzida pela imunização com proteína EnvE_{PII}, foi avaliada através do ensaio ELISA indireto com soro de camundongos coletados 9 dias após a última imunização. Nos camundongos da linhagem BALB/c foram avaliados os títulos dos anticorpos IgG_{Total}, IgG₁ e IgG_{2a}. Observamos que a proteína EnvE_{PII}, associada ou não ao adjuvante alumínio, foi capaz de estimular uma produção robusta de anticorpos das três subclasses analisadas. Resultado semelhante foi observado em soro de camundongos da linhagem C57BL/6. Neste caso, foram avaliados os títulos dos anticorpos IgG_{Total}, IgG₁ e IgG_{2c}. Interessantemente, foi observado maior produção de IgG₁ por animais imunizados com a proteína EnvE_{PII} associada ao adjuvante alumínio, sugerindo que o alumínio auxiliou na ativação da resposta humoral. Trabalhos utilizando outras vacinas contra a dengue, como por exemplo, a vacina Tetra DIIIc, também mostraram o mesmo padrão de produção de anticorpos (Sjatha et al., 2014; Zuest et al., 2015), o que se assemelha também a uma eficiente resposta natural contra o DENV.

Para a avaliação da produção de anticorpos neutralizantes em camundongos BALB/c e C57BL/6 foi realizado um ensaio de soroneutralização utilizando a técnica PRNT₅₀. Resultados preliminares mostraram que apenas os camundongos C57BL/6 foram capazes de produzir anticorpos neutralizantes, indicando que esta linhagem de animal seria adequada para realização de futuros experimentos utilizando proteínas quiméricas do DENV, já que uma vacina protetora e eficaz deve gerar preferencialmente a indução de anticorpos neutralizantes (Thomas, 2014; Yauch & Shresta, 2014; Guy & Jackson, 2016).

Apesar da geração de anticorpos neutralizantes contra o DENV sempre ter sido considerada essencial para o controle da dengue, atualmente a relevância da resposta celular também tem sido extensivamente estudada no controle da infecção causada pelo DENV, principalmente a resposta gerada contra proteínas não estruturais do vírus (Yauch et al., 2010; Han et al., 2012; Bäck & Lundkvist, 2013; Rivino et al., 2013; Amorin et al., 2016). A proteína EnvE_{PII}, apesar de ser constituída de epítomos da proteína estrutural E, foi capaz de induzir uma produção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando

administrada com o adjuvante alumínio em camundongos da linhagem BALB/c no tempo de cultura de 16h, diferente do que foi visto em camundongos C57BL/6, que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos.

Estudos mostraram que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos para antígenos do DENV são importantes no controle da dispersão do DENV para outras células e no controle da replicação intracelular (Gil et al., 2009; Rivino et al., 2013; Yoshida et al., 2013). Além disso, linfócitos T CD8⁺ e citocinas produzidas por ele, foram encontrados em voluntários imunizados com uma vacina tetravalente contendo o DENV atenuado (Weiskopf et al., 2015). Um estudo recente feito em modelo animal de encefalite mostrou que a ativação da resposta celular é promissora para desenvolvimento de vacinas contra a dengue (Amorin et al., 2016).

Para analisarmos a ativação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, foi utilizado o marcador CD25. Em camundongos BALB/c imunizados com a proteína EnvEPII associada ao alumínio, foi observada uma ativação apenas de células T CD8⁺ no tempo de 16 h, enquanto que em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína EnvEPII associada ao alumínio foi observada uma ativação de células T CD4⁺ no tempo de 16 h. Sugerimos que os tempos de cultura de esplenócitos foram curtos, e portanto, inapropriados para analisar o perfil de ativação celular, que ocorre mais tardiamente. Além disso, será necessário repetir os experimentos utilizando proteínas totais do vírus para estimular as células. Esta seria uma alternativa para avaliarmos uma resposta mais semelhante ao natural, devido à dificuldade de desafio dos animais imunizados com DENV.

Nesse trabalho, foi observado que em camundongos da linhagem BALB/c no tempo de 16 h de cultura houve um aumento significativo de linfócitos T CD4⁺CD74⁺ e CD8⁺CD74⁺ no grupo Alú+EnvEPII. Em camundongos C57BL/6, apenas no tempo de 6 h de cultura, vemos um aumento de número de células T CD8⁺CD74⁺ no grupo Alú+EnvEPII comparado ao grupo alumínio, sugerindo que após as 6h de cultura, camundongos desta linhagem consigam controlar essa expressão, mostrando seu perfil de resposta voltado para Th1.

O receptor CD74 é encontrado em diversas células e possui capacidade de se ligar ao fator de inibição de migração de macrófagos (MIF). O MIF é uma

proteína altamente conservada expressa em células humanas e desempenha uma importante função de retenção de macrófagos nos tecidos, inibindo sua motilidade (Asare et al., 2013). Estudos mostram que elevados níveis de MIF são produzidos durante infecções virais e em vários casos a produção de MIF é aumentada para que seja possível a produção de diversas citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e COX2 (Nishihira, 2000; Calandra & Roger, 2003; Chuang et al., 2015). No caso da dengue, inúmeros estudos mostram que o MIF é um mediador extremamente importante na resposta imune do hospedeiro e que existe uma relação entre altos níveis séricos de MIF e a gravidade da doença em pacientes infectados (Chen et al., 2006; Noisakran et al., 2008; Assunção-Miranda et al., 2010; Chuang et al., 2015). Além disso, já foi descrito que o papel do MIF não se limita apenas ao recrutamento de células do sistema imune para o local da infecção causada pelo DENV. Evidências recentes indicam que a produção de MIF induzida pelo DENV pode contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e da replicação viral (Amin et al., 2006; Lee et al., 2008; Heaton & Randall, 2011; Chuang et al. 2011; Shyu et al., 2012; Lee et al., 2013).

Apesar de haver estudos que relacionam o MIF ao agravamento da doença, a expressão da molécula CD74 pode ser benéfica na geração de uma resposta imune mais eficaz, já que a molécula de superfície celular CD74, regula o dobramento e endereçamento de proteínas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) nas células apresentadoras de antígenos (Beswick & Reyes, 2009).

Com relação ao padrão de citocinas produzidas em animais imunizados com a proteína EnvEPII, observamos que camundongos BALB/c produziram as citocinas IL-2 (proliferação celular), IL-17, IFN- γ e IL-4. Em camundongos da linhagem C57BL/6 foram produzidas as citocinas IL-17 e IL-2, pelo grupo de animais imunizados com a proteína EnvEPII associada ao adjuvante alumínio.

Estudos mostram que as concentrações séricas de TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ são muito altas nos primeiros três dias da doença em pacientes infectados pelo DENV, enquanto IL-10, IL-5 e IL-4 tendem a aparecer mais tarde (Rathakrishnan et al., 2012). Assim, sugeriu-se que a resposta Th1 é vista durante os primeiros três dias e a resposta Th2 ocorre posteriormente. Em infecções virais como a dengue, herpes e influenza, por exemplo, a resposta

Th1 está ligada a recuperação da infecção enquanto uma resposta tipo Th2 leva a exacerbação da doença (Chaturvedi et al., 2009). Muitos estudos têm investigado os padrões de citocinas em amostras de soro de pacientes com FHD e estes estudos mostraram que os níveis de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-7 e MIF estão elevados nestes pacientes (Pinto et al., 1999; Chen et al., 2006; Bozza et al, 2008; Malavige et al., 2013).

Em paralelo as respostas Th1 e Th2, a recente descoberta e caracterização das células Th17 e respectiva citocina IL-17 forneceu uma nova via para a comunicação entre imunidade adaptativa e inata. As células Th17 estão envolvidas em uma estratégia de defesa na qual as citocinas produzidas por esta linhagem de célula vão para a periferia e interagem com os neutrófilos, ativando-os para que estes possam ter a sua função pró-inflamatória (Lindenstrøm et al., 2012; Basu et al., 2013). As células Th17 são caracterizadas pela produção de IFN- γ e também pela expressão de marcadores de superfície como a cadeia alfa de IL-18 (IL-18R1) e CXCR3 (Ghoreschi et al., 2010). Além disso, um estudo em humanos mostrou que respostas geradas por linfócitos Th17 apresentam características fenotípicas de células de memória de longa vida, além de possuírem capacidade de controlar a própria proliferação para controlar dano tecidual, bem como plasticidade de converter em outros tipos de células T (Kryczek et al., 2011; Lindenstrøm et al., 2012). Existem alguns estudos que sugerem a relação de células Th17 com a patogênese da dengue, entretanto ainda não foi esclarecida a função exata que a IL-17 exerce durante uma infecção por DENV (Jain et al., 2013; Pagliari et al. 2016), e levando em consideração a capacidade de controlar dano tecidual que essas células possuem, ela poderia auxiliar na recuperação da doença.

Atualmente a relevância da resposta celular tem sido extensivamente estudada no controle da infecção causada pelo DENV (Yauch et al., 2010; Han et al, 2012; Back & Lundkvist, 2013; Rivino et al., 2013; Amorin et al., 2016). Entretanto, estudos sobre a resposta imune gerada em uma infecção causada pelo DENV ainda sugere que uma vacina protetora e eficaz deve gerar preferencialmente a indução de células B. Essa resposta deve resultar em uma eficiente proteção cruzada contra infecções posteriores causada pelo DENV dos quatro sorotipos. Uma resposta eficiente precisa induzir a produção de

anticorpos neutralizantes em níveis e afinidade suficientes para serem efetivos. Além disso, uma vacina contra a dengue deve induzir a produção moderada de citocinas pró-inflamatórias, IFN do tipo I, IL-2 (proliferação celular) e outras citocinas que tenham a capacidade de relacionar a imunidade inata e adaptativa, como por exemplo, o IFN γ . A citocina IL-4 também pode ser importante numa infecção causada pelo DENV, pois promove a diferenciação de linfócitos Th2 e a proliferação e diferenciação de linfócitos B. Com relação aos níveis de células T, uma vacina eficiente contra a dengue deve induzir a produção de células T CD4⁺ e CD8⁺ contra as proteínas do vírus, porém sem um perfil inflamatório exacerbado (Thomas, 2014; Yauch & Shresta, 2014; Guy & Jackson, 2016).

Sendo assim, a imunização com a proteína EnvEPII induziu ativação de células B, resultando em forte produção de anticorpos IgG_{Total}, IgG₁, IgG₂, tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6. Entretanto, a produção de anticorpos neutralizantes foi vista apenas em camundongos C57BL/6. A imunização de camundongos BALB/c induziu a produção de linfócitos TCD3⁺, assim como das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, e maior ativação dessas células (tempo 16 horas). Observou-se também que em camundongos BALB/c houve maior produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-17 e IFN γ , enquanto que em camundongos C57BL/6 houve maior produção das citocinas IL-2 e IL-17.

Além disso, a utilização de outros adjuvantes deve ser testada para se obter um perfil imunogênico mais completo. Atualmente existem inúmeras possibilidades de combinação com o alúmen. Exemplo disso são os CpGs, que são dinucleotídeos microbianos, que se ligam ao TLR9 e já foi visto que a combinação de adjuvantes que apresentam vários mecanismos de ação parecem ser mais eficazes (Krug et al., 2001).

Novos testes são necessários para escolha do melhor candidato para ser usado como vacina contra o DENV.

7 CONCLUSÕES

Das 11 proteínas quiméricas produzidas neste trabalho, cinco foram utilizadas para realização de teste de reatividade e todas elas foram reconhecidas por anticorpos presentes em soros de pacientes já infectados pelo DENV. Além disso, uma das proteínas produzidas, a EnvE_{PII}, se mostrou eficiente em induzir uma resposta humoral e celular em camundongos BALB/c e C57BL/6.

Os resultados deste estudo demonstram que desenhar, sintetizar, expressar e purificar proteínas quiméricas recombinantes em sistemas bacterianos é viável e que proteínas artificiais podem ser importantes candidatas para o desenvolvimento de vacinas ou sistemas de diagnóstico contra doenças infecciosas.

8 PERSPECTIVAS

Realizar experimentos de testes de reatividade com as 11 proteínas produzidas com soro de coelhos imunizados com DENV 1-4, assim como fazer estes mesmos testes com um número maior de soros de indivíduos já infectados pelo DENV1-4.

Otimizar protocolos de imunização e realização de novos experimentos a fim de investigar produção de citocinas, perfil imunofenotípico em animais imunizados após estimulação com proteínas totais do vírus.

Realizar testes em animais com as outras 10 proteínas produzidas, com o intuito de descobrir um alvo vacinal promissor ou uma proteína que seja importante para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 6^a Ed, Editora Saunders, 2007.
- Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, Koch AE. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*. 15;107(6):2252-61, 2006.
- Amorim J.H, Diniz M.O, Cariri F.A, Rodrigues J.F, Bizerra R.S, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine* 30: 837–845, 2012.
- Amorim, J. H; Alves, R. P. S.; Bizerra, R.; Pereira, S. A.; Pereira, L. R.; Fabris, D. L. N.; Santos, R. A.; Romano, C. M.; Ferreira, L. C. S. Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model *Virology*, V. 487, P. 41-49, 2016.
- Anwar A., Too H., Chua K.L. Manipulation of Genes. In: *Microbial Biotechnology: Principles and Applications*. Lee, Y. K. 2nd Ed. World Scientific Publishing Company. London: 2006.
- Asare Y, Schmitt M, Bernhagen J. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Expression and effects in inflammation, atherogenesis and angiogenesis. *Thromb Haemost*. 109(3):391-8, 2013.
- Ashour, J.; Laurent-Rolle M.; Shi PY.; García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*, v. 83, n. 11, p. 5408-18, 2009.
- Ashraf, U.; Ye, J.; Ruan, X.; Wan, S., Zhu, B., Cao, S. An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses*. 7(1), 219-238, 2015.
- Assunção-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, Pacheco P, Barbosa-Lima G, Gomes RN, Bozza PT, Da Poian AT, Teixeira MM, Bozza MT. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J*. 24(1):218-28, 2010.
- Bäck A. T, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 30;3, 2013.
- Basu R, Hatton R D, and Weaver C T. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunol Rev*. 252(1): 89–103, 2013.

Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, Wu SJ, Sun P, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG, Porter KR. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 29;29(5):960-8, 2011.

Benjamin Schubert and Oliver Kohlbacher. Designing string-of-beads vaccines with optimal spacers. *Genome Med*. 8: 9, 2016.

Berthold I, Pombo ML, Wagner L, Arciniega JL. Immunogenicity in mice of anthrax recombinant protective antigen in the presence of aluminum adjuvants. *Vaccine*. 23:p.1993–1999, 2005.

Beswick EJ, Reyes VE. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 21;15(23):2855-61, 2009.

Bhatt, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504-7, 2013.

Bouri N, Sell T.K, Franco C, Adalja A.A, Henderson D.A, Hynes N.A. Return of epidemic dengue in the United States: implications for the public health practitioner. *Public Health Rep*. 127(3):259-66, 2012.

Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 25;8:86, 2008.

Bray M, Lai CJ. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;88(22):10342-6, 1991.

Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*, v.11, n.1, Jan, p.48-53. 2005.

Burke, D.S. and T.P. Monath, *Flaviviruses*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1043-1125, 2001.

Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 179(6):1895-902, 1994.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 3(10), 2003.

Carneiro, F. R., Silva, T. C., Alves, A. C., Haline-Vaz, T., Gozzo, F. C. & Zanchin, N. I. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 343, 260–268, 2006.

Carneiro LA, Travassos LH. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microbes Infect*, 2016.

Chambers, T.J., A. Nestorowicz, and C.M. Rice. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B/3 cleavage site: determinants of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 69(3): p. 1600-5, 1995.

Chaterji S, Allen J.C Jr, Chow A, Leo YS, Ooi E.E. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2):224-8, 2011.

Chaturvedi, U.; Raghupathy, R.; Pacsa, A. et al. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. *Current science*, v. 76, n. 1, p. 63-69, 1999.

Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 74(1):142-7, 2006.

Chen, J., Ng M.M-L., Chu, J.J.H. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 11(7): e1005053, 2015.

Choumet V, Desprès P. Dengue and other flavivirus infections. *Rev Sci Tech.* v.34(2), p.473-8, 2015.

Chuang YC, Chen HR, Yeh TM. Pathogenic roles of macrophage migration inhibitory factor during dengue virus infection. *Mediators Inflamm.* 547094, 2015.

Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine.* 54(2):222-31, 2011.

Clifford R. Robinson And Robert T. Sauer. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 95, pp. 5929–5934, 1998.

Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology.* v.80, p.11418-31, 2006.

Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, et al. 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: 413–423, 2007.

Crill W.D. & Chang G.J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *Journal of Virology*. v.78, p.13975-86, 2004.

Cruz-Oliveira C, Freire J.M, Conceição T.M, Higa L.M, Castanho M.A, Da Poian A.T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*.39(2):155-70, 2015.

De-Araújo, J. M. Schatzmayr H. G, de Filippis A. M, Dos Santos F.B, Cardoso M.A, Britto C, Coelho J.M, Nogueira R.M. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *Journal of Virological methods*, 155: 34-38, 2009.

Drumond B. P., Mondini A., Schmidt D, Bronzoni R.V.M, Bosch I, Nogueira, M. L. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. *PLoS One*. 8(3): e59422, 2013.

Duong, V et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(47): 14688–14693, 2015.

Edelman, R. Dengue and dengue vaccines. *J Infect Dis*, 2005. 191(5): p. 650-3.

Figueiredo, L.T., *Patogenia das infecções pelos vírus do dengue*. Medicina, Ribeirão Preto, 1999. 32: p. 15-20.

Freire J.M, Veiga A.S, Conceicao T.M., Kowalczyk W, Mohana-Borges R, Andreu D, Santos NC, Da Poian AT, Castanho MA. Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein. *PLoS One*. 8:e81450, 2013.

Freire JM, Veiga AS, Rego de Figueiredo I, de la Torre BG, Santos NC, Andreu D, Da Poian AT, Castanho MA. Nucleic acid delivery by cell penetrating peptides derived from dengue virus capsid protein: design and mechanism of action. *FEBS J* 281:191–215, 2014.

Gagnon, S. J., Zeng, W., Kurane, I. & Ennis, F. A. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 70, 141–147, 1996.

Ghoreschi, K.; Laurence, A.; Yang, X. P. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*, v. 467, n. 7318, p. 967-971, 2010.

- Gil L, López C, Blanco A, Lazo L, Martín J, Valdés I, Romero Y, Figueroa Y, Guillén G, Hermida L. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol.* 22(1):23-30, 2009.
- Gregson, A. and R. Edelman, Dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 22(2): p. 179-81, 2003.
- Gromowski G.D. & Barret, A.D. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology.* v.366, p.349-360, 2007.
- Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol.* 195:1071–82, 2011.
- Gubler, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health.*, v39, n.4, p.3-11, 2011.
- Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.
- Gubler, D. J.; Kuno, G.; Markoff, L. Flavivirus. In: Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Ed.). *Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1155-1252, 2007.
- Gubler, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews.* v.11, p.480-96, 1998.
- Guy B, Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nat Rev Microbiol.* 14(1):45-54, 2016.
- Guzman M.G, Halstead S.B, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 8(12 Suppl):S7-16, 2010.
- Guzmán, M.G. & Kourí, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* v.8, p.69-80, 2004.
- Halstead S B, O'Rourke E J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 146: 201–217, 1977.
- Halstead S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* v.60, p.421-67, 2003.
- Halstead S.B., Rojanasuphot S., Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* v.32, p.154-6, 1983.

Han YW, Singh SK, Eo SK. The Roles and Perspectives of Toll-Like Receptors and CD4(+) Helper T Cell Subsets in Acute Viral Encephalitis. *Immune Netw.* 12(2):48-57, 2012.

Harm HogenEsch, Anisa Dunham, Bethany Hansen, Kathleen Anderson, Jean-Francois Maisonneuve, and Stanley L Hem Formulation of a killed whole cell pneumococcus vaccine - effect of aluminum adjuvants on the antibody and IL-17 response. *J Immune Based Ther Vaccines.* 9: 5, 2011.

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 15(9):1347-50, 2009.

Heaton N S, Randall G. Dengue virus and autophagy. *Viruses.* 3(8):1332-41, 2011.

Henchal E.A, Henchal L.S, Schlesinger J.J. Synergistic interactions of antiNS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol* 69 (Pt 8): 2101–2107, 1998.

Henchal, E. A.; Putnak, J. R. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, v.3, n.4, p.376-396, 1990.

Holmes, E. C.; Twiddy, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of Dengue virus. *Infect Genet Evol*, v.3, n. 1, p. 19-28, 2003.

Hundorfean, G.; Neurath, M. F.; Mudter, J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 18, n. 1, p. 180-186, 2012.

Jain A, Pandey N, Garg RK, Kumar R. IL-17 level in patients with Dengue virus infection & its association with severity of illness. *J Clin Immunol.* 33(3):613-8, 2013.

Jaiswal S., Khanna N., Swaminathan S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* v.33, p.80-91, 2004.

Jones LS, Peek LJ, Power J, Markham A, Yazzie B, Middaugh CR. Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens. *J Biol Chem.* 280:13406–13414, 2005.

Kanra G, Viviani S, Yurdakök K, Ozmert E, Yalçın S, Baldini A, Mutlu B, Kara A, Ceyhan M, Podda A. Safety, tolerability and immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* type b vaccine containing aluminum phosphate adjuvant administered at 2, 3 and 4 months of age. *Turk J Pediatr.* 41(4):421-7, 1999.

Kao C.L., King C.C., Chao D.Y., Wu H.L., Chang G.J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* v.38, p.5-16, 2005.

Karp, G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos.* 1ª edição, Barueri, SP. p.53-54, 2005.

Kendrick, P. L. A field study of alum-precipitated combined pertussis vaccine and diphtheria toxoid for active immunization. *Am. J. Epidemiol.* 38 (2):193-202, 1943.

Kool, M., Fierens, K., and Lambrecht, B. N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 61, 927–934, 2012.

Krug A. et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 31(7): 2154-63, 2001.

Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, Moyer J, Klimczak A, Lange A, Zou W. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med.* 12;3(104):104ra100, 2011.

Kuhn, R.J., et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 108(5): p. 717-25, 2002.

Lai C.Y., Tsai W.Y., Lin S.R., Kao C.L., Hu H.P., King C.C., Wu H.C., Chang G.J., Wang W.K. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. *J Virol.* v.82, p.6631-43, 2008.

Lanciotti R.S, Calisher C.H, Gubler D.J, Chang G.J, Vorndam A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30(3):545-51, 1992.

Lee Y R, Lei H Y, Liu M T, Wang J R, Chen S H, Jiang-Shieh Y F, Lin Y S, Yeh TM, Liu C C, Liu H S. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology.* 10;374(2):240-8, 2008.

Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Liu HS. Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci.* 8;20:65, 2013.

Lima, M. R. C. Nogueira R. M, Schatzmayr H. G, dos Santos F.B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease,* 4: e738, 2010.

Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 69(1):82-90, 2003.

Lin, Y.L., Chen L.K., Liao, C.L., Yeh C.T., Ma S.H., Chen J.L. et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol*, 72, pp. 191–200, 1998.

Lindenbach, B. D.; Thiel, H. J.; Rice, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1101-1154, 2007.

Lindenbach, B.D.; Murray, C.L., Rice, C.M, Flaviviridae, in *Fields Virology*, D.M.a.H. Knipe, P.M., Editor. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 991-1041, 2013.

Lindenstrøm T, Woodworth J, Dietrich J, Aagaard C, Andersen P, and Agger E. M. Vaccine-Induced Th17 Cells Are Maintained Long-Term Postvaccination as a Distinct and Phenotypically Stable Memory Subset. *Infection and Immunity* . Volume 80 Number 10. p. 3533–3544, 2012.

Ma, L; Jones C. T; Groesch T. D; Kuhn R. J; Post C. B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *PNAS*, v. 101, n. 10, p. 3414–3419, 2004.

Mackay I.M, Arden K.E, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 15;30(6):1292-305, 2002.

Madigan, M. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Ed. Porto Alegre, Artmed, 2010.

Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS One.* 7(11):e50387, 2012.

Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol.* 92(Pt 12):2821-9, 2011.

Markoff, L., B. Falgout, and A. Chang. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the Dengue virus capsid protein. *Virology.* 233(1): p. 105-17, 1997.

Martina B.E, Koraka P, Osterhaus A.D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):564-81, 2009.

Mason, P.W. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology.* 169(2): p. 354-64, 1989.

Mayhob A. S, Khaliq M, Kuhn R. J, Cushman M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Thiazoles Targeting Flavivirus Envelope Protein. *J Med Chem.* 54:1704-1714, 2011.

Melino, S.; Paci, M. Progress for Dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J*, v.274, n. 12, p. 2986-3002, 2007.

Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameem G, Elkins R, Chanock R, Moss B, Lai CJ. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine.* 15;18(27):3113-22, 2000.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/29/2016-006---Dengue-SE5-publica---o.pdf>. Acesso em: 10/02/2016.

Monath, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.91, p.2395-400, 1994.

Munoz-Jordan, J. L.; Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*, v. 79, n. 13, p. 8004-13, 2005.

Munoz-Jordan, J. L.; Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, n. 24, p. 14333-8, 2003.

Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 30(3):229-33, 2001.

Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res.* 20(9):751-62, 2000.

Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood).* 233(4):401-8, 2008.

Oishi K.; Saito, M.; Mapua, C.A.; Natividad, F.F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother.* v.13, p.125-33, 2007.

Osorio JE, Wallace D, Stinchcomb DT. A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. *Expert Rev Vaccines*, 2015.

Pagliari C, Simões Quaresma JA, Kanashiro-Galo L, de Carvalho LV, Vitoria WO, da Silva WL, Penny R, Vasconcelos BC, da Costa Vasconcelos PF, Duarte MI. Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. *J Clin Virol.* 75:16-20, 2016.

Palacios Serrano H¹, Vargas Caballero ME, Aguirre Portuondo TM. Hemorrhagic dengue in primary dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 53(1):59-62, 2001.

Pierson T.C, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol* V.3, p.3–12, 2013.

Pierson T.C. & Diamond M.S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med.* v.12, p.1-12, 2008.

Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(3):387-94, 1999.

Qi R.F., Zhang L., Chi C.W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin.* v.40, p.91-101, 2008.

Qiagen. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN, Germany, 2003.

Quinan BR, Flesch IE, Pinho TM, Coelho FM, Tschärke DC, da Fonseca FG. An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8(+) T cells and antibody when expressed from modified vaccinia Ankara. *Vaccine.* 23;32(25):2972-9, 2014.

Rajsbaum, R.; Garcia-Sastre, A.; Versteeg, G. A. TRI Mmunity: The Roles of the TRIM E3-Ubiquitin Ligase Family in Innate Antiviral Immunity. *J Mol Biol,* 2013.

Rathakrishnan, A; Wang, S. M.; Hu Y.; Khan A. M.; Ponnampalavanar, S.; Lum L. C. S; Manikam R., and Sekaran S. D. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS One.* 7(12): e52215, 2012.

Remy M.M. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 13(4):262-74, 2014.

Rico-Hesse, R. Microevolution and virulence of dengue virus. *Adv Virus Res.* 59: 315-341, 2003.

Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, Teo GH, Gan VC, Lye DC, Leo YS, Hanson BJ, Smith KG, Bertoletti A, Kemeny

DM, MacAry PA. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *J Virol.* 87(5):2693-706, 2013.

Robert Putnak J, Coller BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Houg HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-Thanan N, McDonell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 15;23(35):4442-52, 2005.

Rodenhuis-Zybert I.A, da Silva Voorham J.M, Torres S, van de Pol D, Smit J.M. Antibodies against immature virions are not a discriminating factor for dengue disease severity. *Dis.* 9(3):e0003564, 2015.

Rodriguez-Madoz, J. R. Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J Virol.* v. 84, n. 19, p. 9760-74, 2010.

Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chambonneau L, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J.* 23(2):99-109, 2004.

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 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, 2012.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.

Schlesinger J.J, Brandriss MW, Walsh E.E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68 (Pt 3): 853–857, 1987.

Scott C. Weaver; Nikos Vasilakis. *Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease.* *Infect Genet Evol.* 9(4): 523–540, 2009.

Shrestha B., Brien J.D., Sukupolvi-Petty S., Austin S.K., Edeling M.A., Kim T., O'Brien K.M., Nelson C.A., Johnson S., Fremont D.H., Diamond M.S. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and

heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* v.6, e1000823, 2010.

Shyu LY, Yeh TM, Chang HH, Lin DP, Teng YH, Chen LC, Lee HH. Macrophage migration inhibitory factor induces ICAM-1 and thrombomodulin expression in vitro. *Thromb Res.* 129(1):43-9, 2012.

Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, Sun W, Putnak JR, Eckels KH, Hutagalung Y, Gibbons RV, Zhang C, De La Barrera R, Jarman RG, Chawachalalai W, Mammen MP Jr. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg.* 78(3):426-33, 2008.

Siqueira, J. B., Jr., C. M. Martelli, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Sjatha, F.; Kuwahara, M.; Sudiro, T. M.; Kameoka M. and Konishi E. Evaluation of chimeric DNA vaccines consisting of pre-membrane and envelope genes of Japanese encephalitis and dengue viruses as a strategy for reducing induction of dengue virus infection-enhancing antibody response. *Microbiol Immunol* 58: 126–134, 2014.

Smucny JJ, Kelly EP, Macarthy PO, King AD. Murine immunoglobulin G subclass responses following immunization with live dengue virus or a recombinant dengue envelope protein. *Am J Trop Med Hyg.* 53(4):432-7, 1995.

Sørensen, H. P.; Mortensen, K. K.. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113–128, 2005.

Suzarte E, Gil L, Valdés I, Marcos E, Lazo L, Izquierdo A, García A, López L, Álvarez M, Pérez Y, Castro J, Romero Y, Guzmán M G, Guillén G, Hermida L. A novel tetravalent formulation combining the four aggregated domain III capsid proteins from dengue viruses induces a functional immune response in mice and monkeys. *Int Immunol.* 27(8):367-79. 2015.

Tan B.H., Fu J.L., Sugrue R.J. Characterization of the Dengue Virus Envelope Glycoprotein Expressed in *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology.* v. 379, p.163-176, 2007.

Teo, D; Ng, L. C.; Lam, C. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfus Med.* 19(2): 66–77, 2009.

Thomas S.J. Developing a dengue vaccine: progress and future challenges. *Ann N Y Acad Sci.* 1323:140-59, 2014.

Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, Putnak R, Toussaint JF, Sun W, Bauer K, Gibbons RV, Innis BL. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-

attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jan;88(1):73-88.

Tripathi N.K., Shrivastva A., Pattnaik P., Parida M., Dash P.K., Gupta N., Jana A.M., Rao P.V. Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol Prog.* v.23, p.488-93, 2007.

Valdés I, Bernardo L, Gil L, Pavón A, Lazo L, López C, Romero Y, Menendez I, Falcón V, Betancourt L, Martín J, China G, Silva R, Guzmán MG, Guillén GHermida L. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology.* 394(2):249-58, 2009.

Villar L, Dayan G.H, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramírez JO, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Miranda Montoya MC, Cortés Supelano M, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tornieporth N, Saville M, Noriega F; CYD15 Study Group. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 8;372(2):113-23, 2015.

Volz A, Fux R, Langenmayer MC, Sutter G. Modified vaccinia virus ankara (MVA)--development as recombinant vaccine and prospects for use in veterinary medicine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 128(11-12):464-72, 2015.

Wahala W.M., Kraus A.A., Haymore L.B., Accavitti-Loper M.A., De Silva A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology.* v.392, p.103-13, 2009.

Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *J Formos Med Assoc.* 112(1):3-11, 2013.

Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F, Tobery TW, Ulmer JB, Evans RK, Caulfield MJ. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminumphosphate. *Vaccine.* 18;18(13):1227-35, 2000.

Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock.* 22(5):460-6, 2004.

Weiser WY, et al. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* 147:2006-2011, 1999.

Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, de Silva AD, Lindow JC, Diehl SA, Whitehead S, Durbin A, Kirkpatrick B, Sette A. The human CD8⁺ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *J Virol.* 89(1):120-8, 2015.

Westaway, E.G., Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res.* 33: p. 45-90, 1987.

Whitehead S.S., Blaney J.E., Durbin A.P., Murphy B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* v.5, p.518-28, 2007.

Whitehead S.S, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol.* 77(2):1653-7, 2003.

Whitehorn J. & Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* v.29, p.7221-7228, 2011.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. WHO Press: Geneva, 2009.

Williams K L, Wahala W M, Orozco S, de Silva A M, Harris E. Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology.* 20;429(1):12-20, 2012.

Wu S.F, Liao C. L, Lin Y.L, Yeh C.T, Chen L.K, et al. 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: 3919–3929, 2003.

Yauch L.E, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res.* 88:315-72, 2014.

Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R., Sette, A. & Shresta, S. A protective role for dengue virus-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol* 182, 4865–4873, 2010.

Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Arch Virol.* 158(6):1209-20, 2013.

Zheng Q., Fan D., Gao N., Chen H., Wang J., Ming Y. 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): 767-771, 2011.

Zuest R, Valdes I, Skibinski D, Lin Y, Toh YX, Chan K, Hermida L, Connolly J, Guillen G, Fink K. Tetravalent dengue DIIIC protein together with alum and ODN elicits a Th1 response and neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 33(12):1474-82, 2015.

ANEXOS

Anexo 1: Comitê de ética em Pesquisa da UFMG

UF G

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº: ETIC 172/99

Interessada: Profa. Erna Geessien Kroon

VOTO:

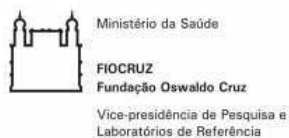
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP aprova definitivamente no dia 16.02.2000 o projeto de pesquisa intitulado: «*Soroprevalência para a Dengue no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais*» e o Termo de Consentimento, do referido projeto, de interesse da Profa. Erna Geessien Kroon. O COEP recomenda acrescentar no termo de consentimento o número do telefone do COEP/UFMG. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari
Presidente, em exercício, do COEP

Av. Alfredo Balena, 110-1º andar
Bairro Santa Efigênia - Cep: 30.130-100 - Belo Horizonte -MG
Telefone: (031) - 248 9364
FAX: (031) 248 9380 - Telex: (031) 2544

Anexo 2: Comitê de Ética no Uso de Animais

**LICENÇA****LW-30/15**

Certificamos que o protocolo (P-60/14-4), intitulado "AVALIAÇÃO HUMORAL DA RESPOSTA GERADA CONTRA PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE DENGUE EM MODELOS MURINOS", sob a responsabilidade de CARLOS EDUARDO CALZAVARA SILVA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/10/2017 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 165 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 8 Semana(s), Peso: 23,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 19 de outubro d

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA