

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Renata Faria de Carvalho

**ESTUDO DA INFECTIVIDADE DA VACINA
TETRAVALENTE DA DENGUE EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES E
SUA APLICABILIDADE EM UM ENSAIO DE POTÊNCIA**

Rio de Janeiro

2021

Renata Faria de Carvalho

ESTUDO DA INFECTIVIDADE DA VACINA TETRAVALENTE DA DENGUE
EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES E SUA APLICABILIDADE EM UM
ENSAIO DE POTÊNCIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Carvalho, Renata Faria de

Estudo da infectividade da vacina tetravalente da dengue em diferentes linhagens celulares e sua aplicabilidade em um ensaio de potência.. / Renata Faria de Carvalho. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

155 f. : fig. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Orientadora: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira.

1. Dengue. 2. Vacina Combinada. 3. Potência. I. Título.

Study of the infectivity of the tetravalent dengue vaccine in different cell lines and its applicability in a potency assay.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Renata Faria de Carvalho

ESTUDO DA INFECTIVIDADE DA VACINA TETRAVALENTE DA DENGUE
EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES E SUA APLICABILIDADE EM UM
ENSAIO DE POTÊNCIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 29/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fausto Klabund Ferrais

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Arnon Dias Jurberg

Universidade Estácio de Sá (UNESA)

Dra. Paula Mello de Lucca

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

ORIENTADOR

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado, me fornecendo uma enorme força e energia para lutar ultrapassando as dificuldades pessoais e profissionais.

As minhas filhas, Gabriela e Júlia, pelo amor e compreensão nos diversos e longos períodos de ausência necessários para realização deste trabalho.

Ao meu marido Ronaldo pelo amor, carinho, paciência e por me incentivar nos momentos de desânimo.

Aos meus pais Edméa e Flávio, e minha irmã Flávia, pelo amor, dedicação e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida.

A minha orientadora Dra. Ana Cristina (Tininha), pela amizade, carinho, dedicação e pelos ensinamentos compartilhados para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela confiança e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus amigos Thaís, Letícia e Lucas pela amizade, carinho, incentivo, paciência e companheirismo em todos os momentos, bons e difíceis. Obrigada por toda contribuição no desenvolvimento desse projeto, que mesmo na pandemia de COVID-19 me ajudaram na realização dos experimentos. Vocês são maravilhosos!

Ao meu chefe do Departamento de Imunologia e amigo Jarbas pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Setor de Cultura de Células, em especial a Anna Christina e Sophia, pela amizade e empenho no fornecimento das células para realização dos ensaios.

A Catia que sempre me incentivou a conquistar meus sonhos.

As minhas amigas Simone, Daniela e Andréa pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Ao Sérgio e Wlamir pela amizade e ajuda nas análises estatísticas do trabalho.

Ao Dr. Fausto Ferraris pela colaboração para realização dos experimentos com iNOS.

Ao Dr. Arnon Jurberg pela ajuda nas análises da fluorescência por microscopia confocal.

Ao Dr. Fábio Amendoeira pela dedicação e ajuda na revisão desta tese.

A Daniela e Cinthia, da plataforma de citometria de fluxo, por toda dedicação e empenho para realização das leituras dos experimentos, mesmo com a pandemia de COVID-19.

À Dra. Raquel Ciuvalschi Maia, chefe do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular do Instituto Nacional de Câncer, por ceder a linhagem HEK293T.

Ao Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Lated) de Bio-Manguinhos, em especial a Keila, pela doação e conjugação do anticorpo 4G2.

Aos meus amigos do Departamento de Imunologia (INCQS/ FIOCRUZ).

A todos da Coordenação de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária pela assistência durante o doutorado.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou
o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

A Dengue, uma arbovirose de zonas tropicais e subtropicais, é um importante problema de saúde pública, com aproximadamente 40% da população mundial em risco da doença. A principal estratégia atualmente para se obter uma medida profilática eficaz na prevenção da doença é o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue, cuja resposta contra os quatro sorotipos virais deve ser balanceada, evitando a ocorrência de dengue grave após a infecção. No Brasil, já existe o registro da vacina heteróloga comercializada pela Sanofi-Pasteur (Dengvaxia®). O controle da qualidade de vacinas é realizado pelo laboratório produtor e deve obedecer a critérios padronizados, estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) é o órgão responsável por garantir a qualidade e a liberação de cada lote de vacina consumido no país, avaliando critérios de qualidade como potência, identidade e termoestabilidade. A determinação da potência da Dengvaxia® pelo produtor baseia-se em ensaio de dose infectante de 50% de cultura de células (CCID₅₀) em células VERO. Contudo, conforme definido pela OMS, a potência de vacinas tetravalentes contra a dengue pode ser determinada em células VERO ou outra sensível ao vírus vacinal. Nesse contexto, as propostas do trabalho foram: avaliar a sensibilidade de três diferentes linhagens celulares humanas (HEK293T, THP-1 e U937) à infecção pelo vírus vacinal no ensaio de potência da vacina tetravalente da dengue, como alternativa metodológica às células VERO, e desenvolver uma metodologia alternativa para avaliação da potência. Para isso, as células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos, HEK293T e VERO (controle) foram infectadas com o vírus vacinal nos tempos de três e sete dias utilizando as metodologias de imunocolorimetria (padronizado pelo produtor) e citometria de fluxo. A linhagem celular HEK293T mostrou-se permissiva à infecção com o vírus vacinal, enquanto que em células dTHP-1 e dU937 não foi possível detectar infecção pelo vírus vacinal, em ensaios por imunocolorimetria. Além disso, foi possível observar, nas células HEK293T, uma diferença significativa entre a potência dos sorotipos vacinais, com uma dominância do sorotipo 4, o que não fora observado em células VERO. Na citometria de fluxo foi possível avaliar a infecção da vacina tetravalente da dengue nas células estudadas, nos tempos de três e sete dias. Ademais, a viabilidade do método de citometria de fluxo foi confirmada pela presença de partículas virais nas células

infectadas por ensaio de imunofluorescência por microscopia confocal. Em relação à comparação entre a metodologia de citometria de fluxo proposta e o ensaio padrão definido pelo produtor na determinação da potência da vacina tetravalente da dengue, foi evidenciado que o método de citometria de fluxo é viável e mais sensível na avaliação da potência da vacina. Dessa forma, a linhagem celular humana HEK293T é uma candidata em potencial para utilização na determinação da potência e identidade de vacinas tetravalentes contra a dengue e a citometria de fluxo mostrou-se uma metodologia alternativa ao ensaio imunocolorimétrico.

Palavras-chave: Dengue. Vacina tetravalente. Potência.

ABSTRACT

Dengue, an arbovirus found in tropical and subtropical areas, is an important problem for the public health with approximately 40% of the world's population at risk of disease. The main strategy currently to obtain an effective prophylactic measure in the prevention of the disease is the development of a tetravalent dengue vaccine, whose response against the four viral serotypes must be balanced, avoiding the occurrence of severe dengue after infection. In Brazil, there is a heterologous vaccine already registered and produced by Sanofi-Pasteur (Dengvaxia®). The quality control of vaccines is carried out by the producer laboratory and must comply with standardized criteria established by the World Health Organization (WHO). The National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is responsible for ensuring the quality and release of each batch of vaccine deployed in the country, evaluating quality criterias such as potency, identity and thermostability. The determination of the potency of Dengvaxia® by the producer is based on a 50% cell culture infective dose assay (CCID₅₀) in VERO cells. However, as defined by the WHO, the potency of tetravalent dengue vaccines can be determined in VERO cells or other cells sensitive to the vaccine virus. In this context, the work proposal was to evaluate the sensitivity of three different human cell lines (HEK293T, THP-1 and U937) to vaccine virus infection in the tetravalent dengue vaccine potency assay, as a methodological alternative to VERO cells, and develop an alternative methodology for potency assessment. For this purpose, THP-1 and U937 cells differentiated into macrophages, HEK293T and VERO (control) were infected with the vaccine virus within three and seven days using immunocolorimetry (standardized by the producer) and flow cytometry methodologies. The HEK293T cell line was shown to be permissive to infection with the vaccine virus, while in dTHP-1 and dU937 cells it was not possible to detect infection by the vaccine virus in immunocolorimetry assays. Furthermore, it was possible to observe, in HEK293T cells, a significant difference between the potency of the vaccine serotypes, with a dominance of serotype 4, which was not observed in VERO cells. In flow cytometry, it was possible to evaluate the infection of the tetravalent dengue vaccine in the studied cells, in the periods of three and seven days. Furthermore, the viability of the flow cytometry method was confirmed by the presence of viral particles in the infected cells by immunofluorescence assay using confocal microscopy. Regarding the comparison between the proposed flow cytometry methodology and the standard assay defined by

the producer in determining the potency of the tetravalent dengue vaccine, it was shown that the flow cytometry method is viable and more sensitive in the evaluation of vaccine potency. Thus, the human cell line HEK293T is a potential candidate to be used in determining the potency and identity of tetravalent dengue vaccines and flow cytometry proved to be an alternative methodology to the immunocolorimetric assay.

Keywords: Dengue. Tetravalent vaccine. Potency.

LISTA DE SIGLAS

aa – Aminoácidos

AC – Anticorpo

Ad – Adenovírus

ADE – Aumento da replicação dependente de Anticorpos (do inglês: *antibody-dependent enhancement*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC - Alofococianina

ATCC – Coleção Americana de Culturas de Células

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

C – Proteína do capsídeo

CCID₅₀ – Dose infectante de 50% da cultura de células (do inglês: *Cell Culture Infectious Dose 50%*)

CD – Cluster of differentiation

CDC – *Center for Disease Control*

CYD-TDV - Vírus vacinal quimérico da vacina tetravalente da dengue (do inglês: *Chimeric yellow-fever/dengue - tetravalent dengue vaccine*)

DC – Dengue clássico

DC-SIGN – DC (*dendritic cell*) – *specific intercelular adhesion molecule 3 – grabbing nonintegrating*

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DENV – Vírus da dengue

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNAs de dupla fita

dTHP-1 – THP-1 diferenciada em macrófago

dU937 – U937 diferenciada em macrófago

E – Proteína do envelope

ECACC – Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas (do inglês: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*)

FcR - Receptor Fc

FD – Febre da dengue

FHD – Febre hemorrágica da dengue

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GRP78/Bip – Proteína reguladora de glicose 78 kDa / Proteína de ligação de imunoglobulina (do inglês: *78-kDa glucose-regulated protein/ immunoglobulin-binding protein*)

HEK 293 – Célula de rim embrionário humano

HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano – DR (do inglês: *Human Leukocyte Antigens*)

Hsp – Proteína do choque térmico (do inglês: *Heat shock protein*)

IFN – Interferon

IFNARs – Receptores IFN α / β

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

iNKT – Células NKT inariantes

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRF - Fatores reguladores de interferon (do inglês: *Interferon regulatory factors*)

ISGs - Genes estimulados por interferon (do inglês: *Interferon stimulated genes*)

ISRE – Elementos responsivos pelo estímulo de interferon (do inglês: *Interferon stimulated response elements*)

JAK – Quinase de Janus (do inglês: *Janus Kinase*)

LATED - Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LM – Células mestre

LT – Células de trabalho

M – Proteína de membrana

MAC – Complexo de ataque à membrana

MBL – Lectinas ligantes de manose (do inglês: *mannose binding lectin*)

MCP – Proteína quimiotática de monócitos (do inglês: *Monocyte chemotactic factor*)

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos (do inglês: *Macrophage colony-stimulating factor*)

MDA5 - Fator de diferenciação do mieloma - 5

MEM – Meio essencial mínimo

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos (do inglês: *Migration inhibition factor*)

MIF – Mediana de intensidade de fluorescência

MMP – *Matrix metalloproteinase*

mNS1 – Proteína NS1 associada à membrana celular

MTase – Atividade metiltransferase

NCR – Região não codificadora

NFκB – Fator nuclear kapa B (do inglês: *Nuclear factor kappa B*)

NIH – Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos

NK – Matadora ou exterminadora natural (do inglês: *Natural Killer*)

NS – Proteína não estrutural

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NTPase – Nucleosídeo trifosfatase

N-terminal – Amino – terminal

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – Tampão Fosfato Salino

PDCs – Células dendríticas plasmocitóides (do inglês: *Plasmacytoid dendritic cells*)

PDK – células primárias de rim de cachorro (do inglês: *primary dog kidney*)

PFA – Paraformaldeído

PI – Iodeto de Propídio

PMA – Forbol Miristato Acetato

PNI – Programa Nacional de Imunizações

POP – Procedimento Operacional Padrão

prM – Proteína pré-membrana

PRNT – Teste de neutralização por redução de placas

PRPCQ – Protocolo Resumido da Produção e Controle da Qualidade

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês: *pattern recognition receptor*)

PU – Procedimento de Uso

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Retículo endoplasmático

RIG-I - Gene induzido pelo ácido retinóico - I

RLRs - *RIG-I-like receptors*

RNA – Ácido ribonucleico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RpRd - RNA polimerase dependente de RNA

RTPase – Atividade RNA trifosfatase 5' terminal

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa

SCD – Síndrome de choque por dengue

SE – Semana epidemiológica

SFB – Soro fetal bovino

sNS1 – Proteína NS1 secretada para meio extracelular na forma de hexâmero

ssRNA – RNA de fita simples

STAT – *signal transducer and activator of transcription*

SV 40 – *Simian vírus 40*

TGN – Trans Golgi Network

THP1 – Tohoku Hospital Pediatrics-1 (Célula de leucemia monocítica humana)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TLR – Receptor do tipo Toll (do inglês: *Toll-like receptor*)

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (do Inglês: *Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

ORF – *Open reading frame*

UFP – Unidades formadoras de placas

UTR – Região não traduzida (do inglês: *untranslated region*)

U937 – Célula de linfoma histocítico humano

vD3 – 1,25-dihidroxitamina D3

VERO – Célula de rim de macaco verde Africano (do Inglês: *kidney epithelial cells extracted from an African green monkey*)

YF17D – cepa da vacina 17D contra a febre amarela

YFV – Vírus da Febre Amarela (do inglês: *Yellow fever virus*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oswaldo Cruz e Brigada “mata-mosquito”	23
Figura 2 - Distribuição de dengue no mundo.....	24
Figura 3 - Distribuição dos casos notificados de dengue e proporções dos casos graves, por ano. Região das Américas, 1999 – 2020 (até junho).....	26
Figura 4 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil, por semana epidemiológica, dos anos 2019 e 2020	28
Figura 5 - Situação epidemiológica da dengue no Brasil, com casos prováveis, hospitalizações e atividade viral, 1986 - 2021*.....	29
Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue	30
Figura 7 - Esquema de organização do genoma do DENV.....	32
Figura 8 - Monômero da glicoproteína E e seus domínios	33
Figura 9 - Ciclo replicativo do vírus da dengue	36
Figura 10 - Classificação clínica dos casos de dengue de acordo com OMS, 2009 ..	38
Figura 11 - Figura esquemática do mecanismo de aumento dependente de anticorpo (ADE)	43
Figura 12 - Teoria Integral de Multicausalidade	44
Figura 13 - Fluxograma com as fases desenvolvimento da vacina	46
Figura 14 - Construção das quatro vacinas quiméricas produzidas pela Sanofi Pasteur.....	50
Figura 15 - Diluição seriada em megaplaca	75
Figura 16 - Diluições virais na microplaca contendo as células	76
Figura 17 - Caracterização morfológica da diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos.....	83
Figura 18 - Medida da área citoplasmática das células THP-1 e U937 tratadas com PMA	84
Figura 19 - Produção de NO em células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos	86
Figura 20 - Avaliação da expressão do receptor CD11b nas células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos após tratamento com PMA	88
Figura 21 - Gráfico mostrando a viabilidade das células THP-1 e U937 tratadas com diferentes concentrações de PMA.....	89

Figura 22 - Infecção com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue em células dTHP1, dU937 e VERO por imunocolorimetria	91
Figura 23 - Infecção com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue em células HEK293T e VERO por imunocolorimetria	92
Figura 24 - Curva dose-resposta para cada sorotipo da vacina dengue em células HEK293T e VERO, após três dias de infecção	94
Figura 25 - Curva dose-resposta para cada sorotipo da vacina dengue em células HEK293T e VERO, após sete dias de infecção	95
Figura 26 - Comparação da infectividade de cada sorotipo do vírus vacinal em células HEK293T e VERO, após três dias de incubação	97
Figura 27 - Comparação da infectividade de cada sorotipo do vírus vacinal em células HEK293T e VERO, após sete dias de incubação	98
Figura 28 - Potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID ₅₀ /dose, determinada em células HEK293T e VERO após três dias de incubação com o vírus vacinal.....	99
Figura 29 - Potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID ₅₀ /dose, determinada em células HEK293T e VERO após sete dias de incubação com o vírus vacinal.....	100
Figura 30 - Potências médias, medida em \log_{10} CCID ₅₀ /dose, estimadas em células HEK293T e VERO após três e sete dias de incubação com o vírus vacinal.....	101
Figura 31 - Estratégia de <i>gate</i> utilizada na titulação do anticorpo 4G2.	102
Figura 32 - Titulação anticorpo 4G2 utilizando células VERO infectadas com a vacina tetravalente da dengue na diluição 10^{-1}	103
Figura 33 - Razão das medianas de intensidade de fluorescência das células VERO, dTHP-1, dU937 e HEK293T nos tempos de três e sete dias de infecção viral	105
Figura 34 - Comparação dos tempos três e sete dias de infecção nas células VERO, HEK293T, dTHP-1 e dU937	106
Figura 35 - Microscopia de imunofluorescência confocal de células VERO, HEK293T, dTHP-1 e dU937 infectadas ou não com vacina tetravalente da dengue, após sete dias de incubação	108
Figura 36 - Curva dose-resposta mostrando resposta das células VERO utilizando as metodologias de citometria de fluxo e imunocolorimetria, após três e sete dias de infecção com a vacina tetravalente da dengue	110
Figura 37 - Potências médias, em \log_{10} CCID ₅₀ /dose, estimadas por citometria de fluxo e imunocolorimetria, no tempo de três e sete dias	111

Figura 38 - Estimativa das potências médias, em \log_{10} CCID₅₀/dose, em células VERO por citometria de fluxo e imunocolorimetria, após três e sete dias de incubação com o vírus vacinal 112

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Vacinas Tetravalentes contra dengue	49
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Aspectos Históricos	21
1.2	Epidemiologia da dengue.....	24
1.3	Vetor e agente etiológico da dengue	30
1.4	Vírus da dengue	31
1.5	Ciclo replicativo	34
1.6	Sintomatologia da dengue	36
1.7	Resposta imunológica inata	38
1.8	Mecanismos Imunológicos na FHD.....	42
1.9	Vacinas	45
1.9.1	Vacina da dengue.....	48
1.9.2	Resposta imunológica da vacina da dengue	54
1.10	Vigilância sanitária e controle da qualidade de vacinas	55
1.10.1	Ensaios de potência	56
1.10.2	Uso de citometria de fluxo na avaliação de imunobiológicos.....	58
1.10.3	Uso de culturas de células em ensaios biológicos.....	59
1.10.3.1	Linhagem celular VERO	60
1.10.3.2	Linhagem celular HEK293T.....	61
1.10.3.3	Linhagem celular THP-1.....	62
1.10.3.4	Linhagem celular U937.....	62
2	JUSTIFICATIVA	64
3	OBJETIVOS	66
3.1	Objetivo geral.....	66
3.2	Objetivos específicos.....	66
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
4.1	Amostras de vacinas	67
4.2	Cultura de Células	67
4.2.1	Manutenção das linhagens celulares.....	67
4.2.2	Preparo e fornecimento das suspensões celulares	70
4.3	Padronização do protocolo de diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos	71
4.3.1	Dosagem de nitrito pelo método de Griess.....	72

4.3.2	Determinação da diferenciação de células THP-1 e U937 pela expressão de CD11b em citometria de fluxo	72
4.4	Determinação do título da infecção e identificação da vacina dengue na célula VERO por imunocolorimetria	73
4.4.1	Preparação da diluição seriada em megaplaca	74
4.4.2	Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas.....	75
4.4.3	Coloração das células para determinação de infecção viral	76
4.5	Desenho experimental para determinação do título da infecção e identidade da vacina dengue para as linhagens celulares THP-1, U937 e HEK293T por método imunocolorimétrico.....	77
4.6	Determinação da curva de titulação da infecção e identidade vacinal para células HEK293T por imunocolorimetria.....	78
4.7	Avaliação da marcação intracelular do vírus vacinal por citometria de fluxo.....	79
4.8	Imunofluorescência	80
4.9	Análise estatística.....	81
5	RESULTADOS	82
5.1	Diferenciação das linhagens celulares THP-1 e U937 em macrófagos	82
5.2	Avaliação da infectividade por imunocolorimetria das células dTHP-1, dU937 e HEK293T	90
5.3	Determinação de uma curva dose-resposta para a vacina CYD-TDV nas células HEK293T	93
5.4	Avaliação da potência para os diferentes sorotipos da vacina tetravalente da dengue em células HEK293T e VERO	95
5.5	Determinação da potência da vacina tetravalente para a dengue utilizando células HEK293T e VERO	98
5.6	Detecção da infectividade da vacina tetravalente da dengue em células HEK293T, dTHP-1, dU937 e VERO por metodologia alternativa	101
5.6.1	Determinação da infectividade por Citometria de Fluxo	101
5.6.2	Determinação da infectividade por microscopia confocal	107
5.7	Comparação das potências da vacina tetravalente da dengue estimadas por citometria de fluxo e imunocolorimetria, em ensaio com células VERO... ..	109
6	DISCUSSÃO.....	113
7	CONCLUSÃO.....	126

8	QUESTÕES EM ABERTO E PERSPECTIVAS.....	128
	REFERÊNCIAS.....	129
	ANEXO A – Medida da área citoplasmática das células THP-1 e U937 tratadas e não tratadas com pma	151
	ANEXO B – INFECÇÃO COM O SOROTIPO 2 DO VÍRUS VACINAL DA DENGUE, NA DILUIÇÃO 10^{-2,6}, EM CÉLULAS HEK293T, dTHP-1, dU937 E VERO POR IMUNOCOLORIMETRIA.....	152

1 INTRODUÇÃO

A Dengue, uma arbovirose de zonas tropicais e subtropicais, é um importante problema de saúde pública, com aproximadamente 40% da população mundial em risco da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021a). O quadro clínico da doença inclui infecção assintomática, febre branda, febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome de choque por dengue (SCD) (SAN MARTIN *et al.*, 2010; SCHWARTZ *et al.*, 2015). Os casos mais graves são FHD e SCD que podem resultar em significativa morbidade e mortalidade (LAM, 2013). A dengue é endêmica em mais de 100 países e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas em todo mundo estão em risco de infecção (ZELLWEGER *et al.*, 2013, VILLAR *et al.*, 2015). Estima-se que 390 milhões de casos de infecção pelo vírus da dengue (DENV) ocorram anualmente, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente, 500.000 são graves e 20.000 são fatais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b; BHATT *et al.*, 2013).

A crescente incidência e amplo alcance geográfico da dengue fazem com que o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o agente etiológico dessa doença seja considerado como prioridade mundial (REITER, 2010). Atualmente, algumas vacinas já avançam no processo de liberação, sendo que no Brasil já existe o registro da vacina heteróloga comercializada pela Sanofi-Pasteur (VILLAR *et al.*, 2015).

1.1 Aspectos Históricos

As primeiras descrições do quadro clínico compatível com a dengue ocorreram na China do século III, durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.) e foram registradas em uma enciclopédia chinesa, nos anos 610 d.C e 992 d.C. durante a Dinastia Tang e Dinastia Norte Sung respectivamente (SALLES *et al.*, 2018). Os relatos descreviam uma doença chamada “veneno da água”, devido a sua relação com insetos voadores associados à água. Após uma longa ausência no registro histórico, relatos de surtos epidêmicos de febre aguda da doença, podendo ser associada a dengue, surgiram no Oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699 (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

No Brasil, o primeiro caso de dengue foi descrito na cidade de Recife em 1685 e após sete anos, em Salvador, uma epidemia de dengue levou a 2000 óbitos (SALLES *et al.*, 2018).

Em 1779 e 1780 apareceram os primeiros relatos de uma epidemia do DENV ou doença semelhante nos continentes da Ásia, África e América do Norte. Em 1780, durante uma epidemia na Filadélfia, Dr. Benjamin Rush descreveu o quadro clínico da dengue como “Febre quebra-ossos” (RUSH, 1789). Em 1906, Bancroft demonstrou que o mosquito *Aedes aegypti* foi responsável pela disseminação da dengue (BARNETT, 2017) e a transmissão foi confirmada por Siler, Hall e Hitchens em 1926 (SILER; HALL; HITCHENS, 1926).

Durante a Segunda Guerra Mundial os primeiros casos do isolamento do vírus da dengue ocorreram no Japão, Nova Guiné e Havaí, a partir do soro de soldados infectados com o vírus (GIBBONS *et al.*, 2012; SALLES *et al.*, 2018). O fim da Guerra levou a uma urbanização descontrolada, onde habitações inadequadas, sistemas de distribuição de água, esgoto e gestão de resíduos, permitiram que o vetor (*Ae. Aegypti*) atingisse altas densidades, facilitando a dispersão dos sorotipos DENV entre diversas regiões geográficas (WEAVER; VASILAKIS, 2009). A primeira epidemia confirmada de FHD ocorreu em Manila, nas Filipinas, em 1953 e 1954, mas em 20 anos a doença se espalhou por todo sudeste Asiático (GUBLER, 1998).

No início do século XX, Oswaldo Cruz (Figura 1A) implementou um programa de controle de mosquitos que durou muitos anos e o grande desafio na época foi a epidemia de febre amarela (Figura 1B) (SALLES *et al.*, 2018; DICK *et al.*, 2012). Em 1947, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) aprovou o plano de erradicação do *Ae. aegypti* para combater as epidemias de febre amarela urbana, o que levou ao silenciamento da DENV nas Américas por 20 anos (SALLES *et al.*, 2018; GUBLER, 2002). No entanto, o abandono desse programa no início da década de 1970, permitiu a reinfestação gradual do mosquito *Ae. aegypti* sendo um processo que continuou até os anos 90 (HALSTEAD, 2006).

Figura 1 - Oswaldo Cruz e Brigada “mata-mosquito”



Fonte: Base Arch, Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz. Referências: BR RJCOO 02-10-20-15-003-011 e BR RJCOO 02-10-20-40-001-011. Oswaldo Cruz em 1903 (1A) e Brigada de combate à epidemia de febre amarela eliminando focos do mosquito, em 1904 (1B).

Na década de 1990 e início do século XXI, ocorreu uma distribuição global de todos os sorotipos do DENV, devido à expansão das populações urbanas, ao aumento da densidade vetorial por programas de controle insustentáveis e ao aumento de viagens aéreas comerciais facilitando a movimentação de pessoas infectadas (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

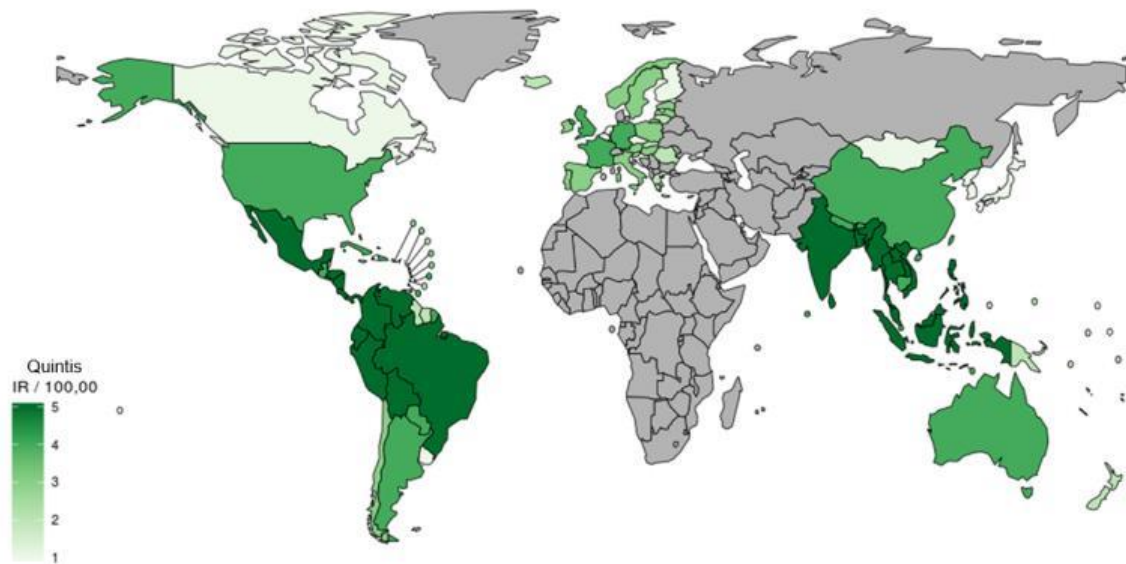
O *Ae. aegypti* foi erradicado no Brasil na década de 1950 e retornou no ano de 1980. Em 1981-82 foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 durante uma epidemia em Roraima (OSANAI *et al.*, 1983), mas foi a partir de 1986 que a dengue se tornou um problema de saúde pública nacional, com a introdução do DENV-1 no estado do Rio de Janeiro (RJ) (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986). A introdução do DENV-2 foi em 1990, também no estado do RJ, onde ocorreu um aumento na gravidade da doença e a notificação dos primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) no país (HERINGER *et al.*, 2015). Em dezembro de 2000, um novo sorotipo, o DENV-3, foi detectado no município de Nova Iguaçu – RJ, sendo responsável pelo aumento acentuado nos casos de dengue clássico (DC) e FHD (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Em julho de 2010, o DENV-4 foi isolado em Roraima, 28 anos após a primeira detecção no mesmo estado, e em 2011 no Rio de Janeiro (HERINGER *et al.*, 2015; TEMPORÃO *et al.*, 2011).

1.2 Epidemiologia da dengue

A incidência da dengue tem crescido muito em todo o mundo nas últimas décadas. Antes de 1970, apenas nove países tinham epidemias de dengue grave, agora a doença é endêmica em mais de 100 países nas regiões da África, das Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental. As regiões da América, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais afetadas. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b).

Conforme a Figura 2, é possível observar que as maiores incidências da doença se concentram nas regiões tropicais do globo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma defasagem nos números da doença, principalmente nos países africanos e do Oriente Médio, relacionada à subnotificação dos casos, como apontado pelos modelos epidemiológicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017a).

Figura 2 - Distribuição de dengue no mundo



Legenda: Representação mundial dos países afetados pela dengue. Escala de tons em verde, variando de 5 a 1, onde os tons fortes (5) indicam a maior incidência e tons mais claros, a menor incidência da doença (1).

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017b).

Casos nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental excederam 1,2 milhão em 2008 e mais de 3,34 milhões em 2016. Recentemente, o número de casos relatados continua alto. Em 2015, 2,35 milhões de casos de dengue foram notificados

nas Américas, dos quais 10.200 casos foram diagnosticados como dengue grave com 1.181 óbitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b; SHARP; PEREZ-PADILLA; WATERMAN, 2015).

O ano de 2016 caracterizou-se por grandes surtos de dengue em todo mundo, onde a região das Américas relatou mais de 2,38 milhões de casos de dengue, a região do Pacífico Ocidental mais de 375.000 casos suspeitos de dengue e as Ilhas Salomão declararam um surto com mais de 7.000 casos suspeitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b).

Em 2017, foi relatada uma redução de 73% no número de casos de dengue nas Américas - de 2.177.172 casos em 2016 para 584.263 casos em 2017 - e redução de 53% de casos graves de dengue. Os únicos países que registraram um aumento de casos em 2017 foram Panamá, Peru e Aruba. Na região do Pacífico Ocidental vários países relataram surtos de dengue com a circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b).

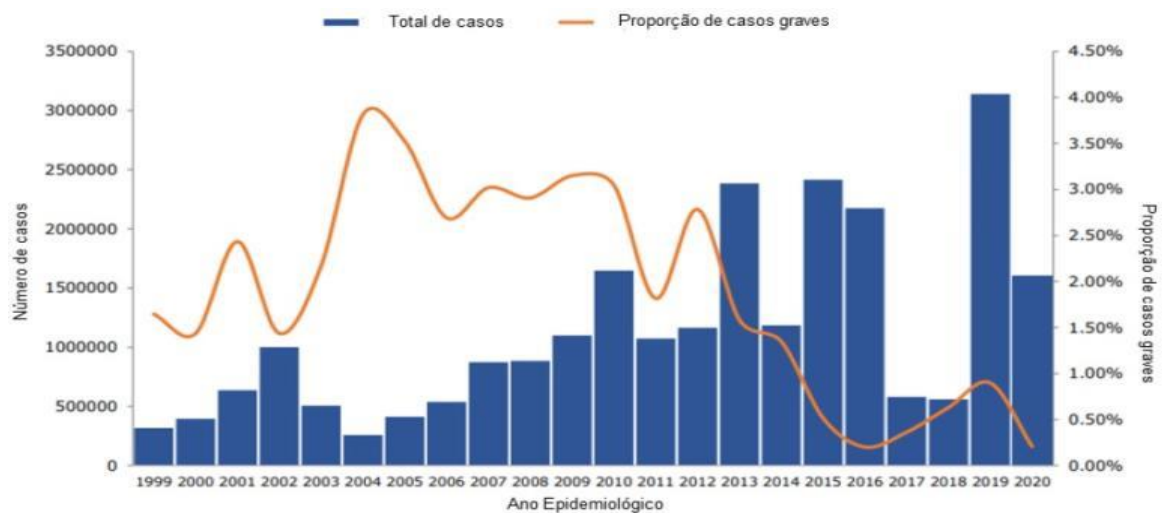
No período pós-surto de zika (depois de 2016) foi registrado através de notificações um declínio nos casos de dengue. A ocorrência de epidemias cíclicas de arboviroses por diferentes flavivirus, como dengue e zika, por exemplo, influenciam a patogênese da doença devido às reações cruzadas que podem ocorrer entre os anticorpos e os vírus, levando à neutralização ou ao aprimoramento dependente de anticorpos (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Entretanto, apenas isso não é capaz de justificar a redução acentuada do número de casos de dengue notificados nas Américas em 2017 e 2018 (LOPES *et al.*, 2018). O controle de vetores também não pode ser utilizado como justificativa, uma vez que o número de casos notificados de chikungunya aumentou em 2016 e 2017. Portanto, os fatores que levaram a essa queda ainda são desconhecidos (LOPES *et al.*, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b).

Após uma queda no número de casos em 2017-18, um aumento acentuado de casos foi observado em 2019. Na região do Pacífico Ocidental, foi relatado um aumento de casos na Austrália, Camboja, China, Malásia, Filipinas, Cingapura, Vietnã, enquanto DENV-2 foi reportado na Nova Caledônia e DENV-1 na Polinésia Francesa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

Na região das Américas, em 2019, foram relatados 3.139.335 casos de dengue (321,58 casos por 100.000 habitantes), incluindo 1538 óbitos. Do total de casos, 1.367.353 (43,6%) foram confirmados em laboratório e 28.169 (0,9%) foram

classificados como dengue grave. O número de casos relatados nesse período foi o maior registrado nas Américas, superando em 30% o número de casos notificados no período epidêmico de 2015-2016, conforme Figura 3 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020a).

Figura 3 - Distribuição dos casos notificados de dengue e proporções dos casos graves, por ano. Região das Américas, 1999 – 2020 (até junho)



Legenda: As barras azuis indicam o número de casos e a linha laranja mostra a proporção de casos graves de dengue, na Região das Américas, ao longo dos anos de 1999 – 2020.
Fonte: (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020c).

Na região das Américas, até dezembro de 2020, mesmo com a pandemia do SARS-CoV-2, foram relatados 2.163.354 casos de dengue (uma incidência de 221,6 casos por 100.000 habitantes), incluindo 872 óbitos. Desse total, 963.787 (45%) casos foram confirmados laboratorialmente e 5.197 (0,2%) foram classificados como dengue severa (casos graves). A taxa de mortalidade ficou em 0,04%, a menor nos últimos 10 anos, o que se acredita estar associado com a simultaneidade da pandemia da COVID-19 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020b).

Além disso, embora o número de casos seja inferior aos dados do ano de 2019, os resultados de 2020 são superiores aos reportados entre 2016-2018 (Figura 3), com o maior crescimento no número de casos, em duas sub-regiões (Caribe não latino e Andes), desde o ano epidêmico de 2015 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020b). Esses dados, segundo a OPAS, são preocupantes, visto que a manutenção de taxas elevadas em regiões endêmicas junto à chegada do verão no hemisfério sul, estação associada com um crescimento no número de casos de dengue, podem representar um importante desafio aos sistemas de saúde, já

fragilizados, dos países que terão que lidar de forma concomitante com os casos de dengue e de COVID-19 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020b).

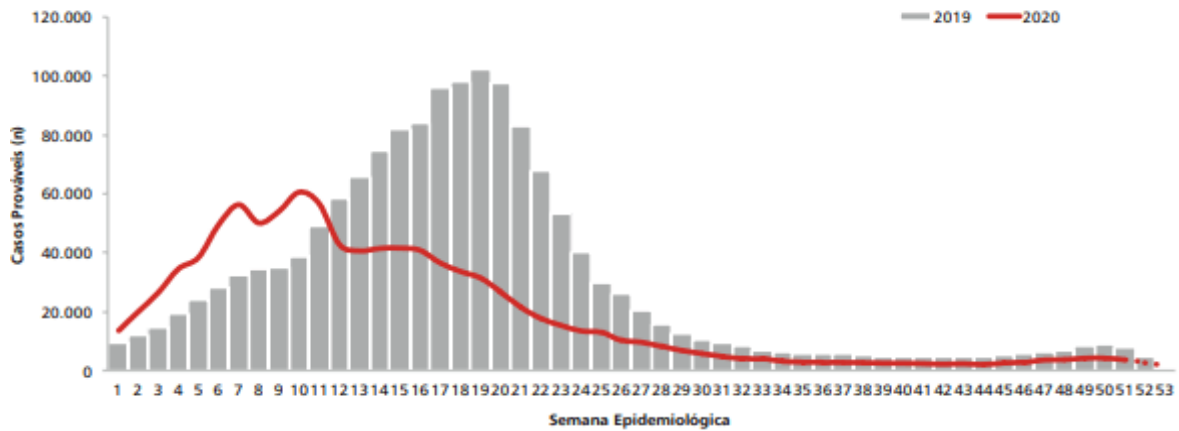
Mundialmente, estima-se que 500.000 pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização a cada ano, sendo uma grande parte crianças e cerca de 2,5% dos enfermos vêm a óbito (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

O Brasil relatou mais de 1,5 milhão de casos em 2015, cerca de três vezes mais do que em 2014 (BRASIL, 2016). Em 2016, foram registrados 1.483.623 casos de dengue. Em 2017, conforme o boletim do Ministério da Saúde foi registrado 252.054 casos prováveis de dengue no país, sendo o Nordeste do país a região que registrou o maior número de casos prováveis, seguida das regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Sul do país (BRASIL, 2018).

Em 2019, foram registrados 1.544.987 casos prováveis de dengue no Brasil, um aumento de 599,5% em relação ao ano de 2018. Deste total, 1.419 foram confirmados como dengue grave, 18.740 casos de dengue com sinais de alarmes e 782 óbitos (BRASIL, 2020; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Em 2020, foram notificados 987.173 casos prováveis com uma taxa de incidência de 469,8 casos por 100.000 habitantes. Como ilustrado pela Figura 4, a curva de casos prováveis de dengue notificados em 2020 é superior à do ano de 2019, no entanto, a partir da semana epidemiológica (SE) 12, quando se inicia, mais efetivamente, a pandemia da COVID-19 no Brasil, há uma queda no número de notificações quando comparado aos números de 2019. Acredita-se que essa queda possa estar associada à mobilização das equipes de saúde e vigilância epidemiológica para o enfrentamento da pandemia, o que pode ter gerado atrasos ou subnotificações nos casos de arboviroses no Brasil (BRASIL, 2021b).

Figura 4 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil, por semana epidemiológica, dos anos 2019 e 2020



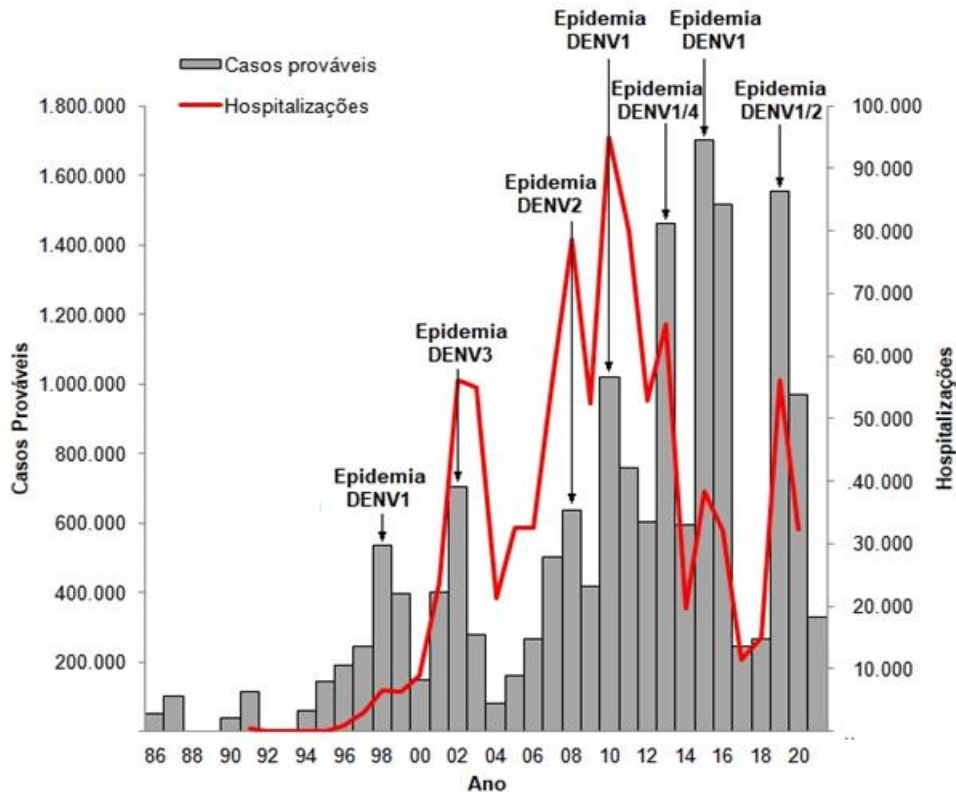
Legenda: Os números de casos prováveis de dengue estão representados em barras cinza para o ano de 2019 e linha vermelha para o ano 2020.

Fonte: (BRASIL, 2021b).

Em 2021, até a SE 20, foram registrados 330.078 casos prováveis de dengue no Brasil, uma redução de 58,5 % de casos registrados no mesmo período analisado em comparação ao ano de 2020 (BRASIL, 2021a).

Atualmente temos os quatro sorotipos do DENV circulando em todas as regiões do Brasil. A sucessão de sorotipos predominantes determinou ciclos de transmissão de dengue no país, que atingiram seus picos em 1998 (DENV-1), 2002 (DENV-3), 2008 (DENV-2), 2010 (DENV-1), 2013 (DENV-1/4), 2015 (DENV-1) e 2019 (DENV-1/2), conforme Figura 5. O gráfico mostra que a epidemia por cada sorotipo do DENV acontece em anos distintos, sugerindo que uma imunidade, individual e coletiva, específica pode prevenir a recorrência do mesmo sorotipo, sendo que, após um ano, essa imunidade tem seu efeito de proteção cruzada minimizado, permitindo que outro sorotipo do vírus da dengue cause um surto (ENDY *et al.*, 2002).

Figura 5 - Situação epidemiológica da dengue no Brasil, com casos prováveis, hospitalizações e atividade viral, 1986 - 2021*



Legenda: Sinan online, dados atualizados em 22/05/2021 (até a Semana Epidemiológica 20). As barras cinza indicam os casos prováveis de dengue, a linha vermelha o número de hospitalizações ao longo dos anos de 1986 - 2021 e as setas pretas as epidemias que aconteceram em determinados anos.

Fonte: (Adaptado de GUY *et al.*, 2011).

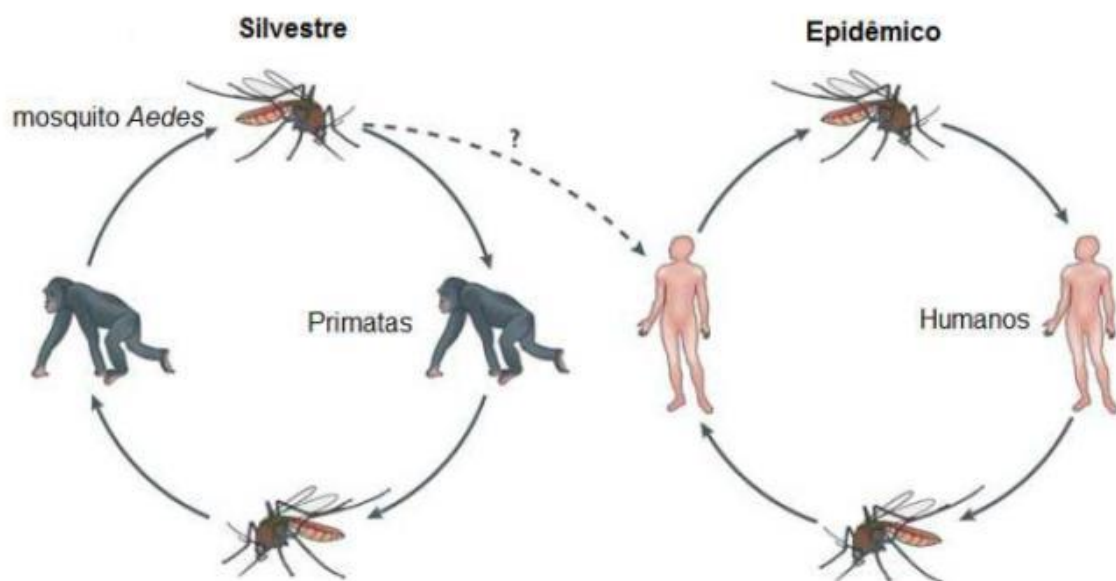
Na literatura algumas hipóteses foram levantadas para as razões do aumento de hospitalizações em determinadas epidemias que são: (i) infecções secundárias ou terciárias, que levam ao modo de multiplicação do vírus dependente de anticorpos (ADE), (ii) circulação de múltiplos sorotipos, que leva a coinfeções, (iii) mudança de sorotipo / genótipo em uma determinada região geográfica, (iv) mudança no material genético através da aquisição de mutações de nucleotídeos / aminoácidos (VADDADI *et al.*, 2017; HOLMES; BURCH, 2000).

Portanto, a cocirculação de diferentes sorotipos, ocorrência de coinfeções e presença de cepas de alta virulência contribuem para o aumento da ocorrência de dengue grave (VADDADI *et al.*, 2017).

1.3 Vetor e agente etiológico da dengue

O vírus da dengue é transmitido através da picada de fêmeas hematófagas infectadas, sendo o mosquito *Aedes aegypti* o principal vetor da dengue. O mosquito se infecta após ingerir sangue de um indivíduo durante a fase de viremia (3 - 4 dias) e pode transmitir o vírus para outro indivíduo depois de um período de incubação extrínseca de 10 - 12 dias (Figura 6) (RIGAU-PEREZ *et al.*,1998). O mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus pelo resto de sua vida (6- 8 semanas) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). O *Ae. aegypti* vive em ambientes urbanos e ovipõe em água limpa, preferencialmente em recipientes artificiais.

Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue



Legenda: Representação de ciclo silvestre de transmissão da dengue entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* e o ciclo epidêmico de transmissão entre Humanos e mosquitos.

Fonte: (Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007).

O *Aedes albopictus* é considerado vetor secundário do DENV, principalmente de ambiente silvestre que se tornou adaptado às regiões tropicais. Nas últimas décadas, espalhou-se da Ásia para a África, as Américas e a Europa, em grande parte devido ao comércio internacional de pneus usados, onde os ovos são depositados quando contêm água da chuva (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017c; LIMA-CAMARA *et al.*, 2014).

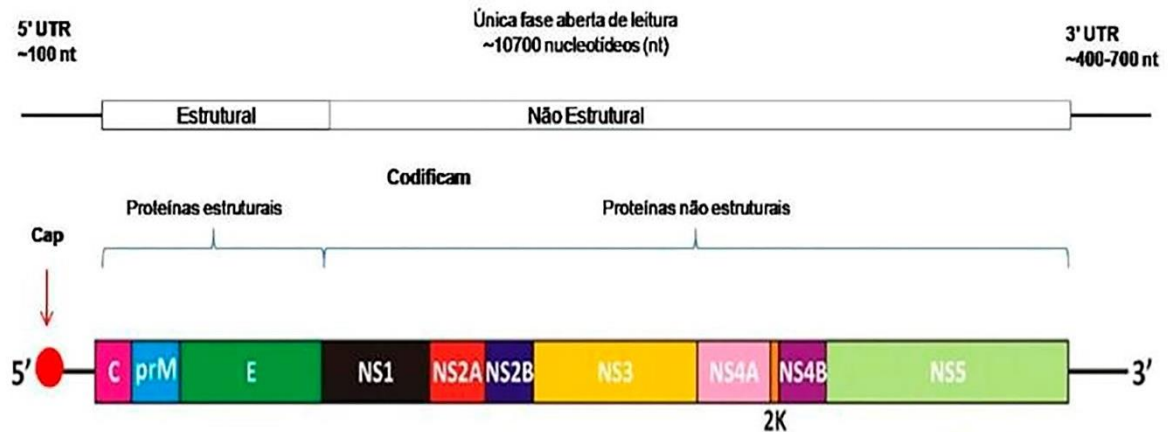
Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são considerados diurnos com maior atividade no início da manhã e no final do dia antes de anoitecer. No entanto, estudos demonstram que os mosquitos *Aedes* quando infectados com DENV tem seu ciclo circadiano alterado, principalmente pelos efeitos de luz e temperatura o que torna mais ativo durante a noite (RIVAS *et al.*, 2018).

Em casos raros, a transmissão do vírus pode ocorrer a partir de órgãos transplantados ou transfusão de sangue de doadores infectados e há evidências de transmissão vertical (gestante – bebê) (BRASIL, 2017; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014a).

1.4 Vírus da dengue

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* de pequenos vírus envelopados e possui quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (ROTHMAN, 2004). Os *Flavivirus* são esféricos, possuem genoma RNA de fita simples e polaridade positiva com aproximadamente 50 nm de diâmetro (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015, HALSTEAD, 1988). O RNA viral possui aproximadamente 11.000 nucleotídeos, com uma pequena região 5' capeada e não codificadora (NCR), uma janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) e uma região não codificadora terminal 3', que não contém uma cauda poliadenilada (Poli A) (ALVAREZ *et al.*, 2005). O ORF codifica uma longa poliproteína que é processada por proteases virais e da célula hospedeira para produzir 10 proteínas virais, sendo três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM precursora da M) e do envelope (E); e sete proteínas não estruturais (NS) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Figura 7) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; QI; ZHANG; CHI, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

Figura 7 - Esquema de organização do genoma do DENV



Legenda: O genoma é constituído de RNA fita simples de polaridade positiva e possui uma única fase aberta de leitura que codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais.

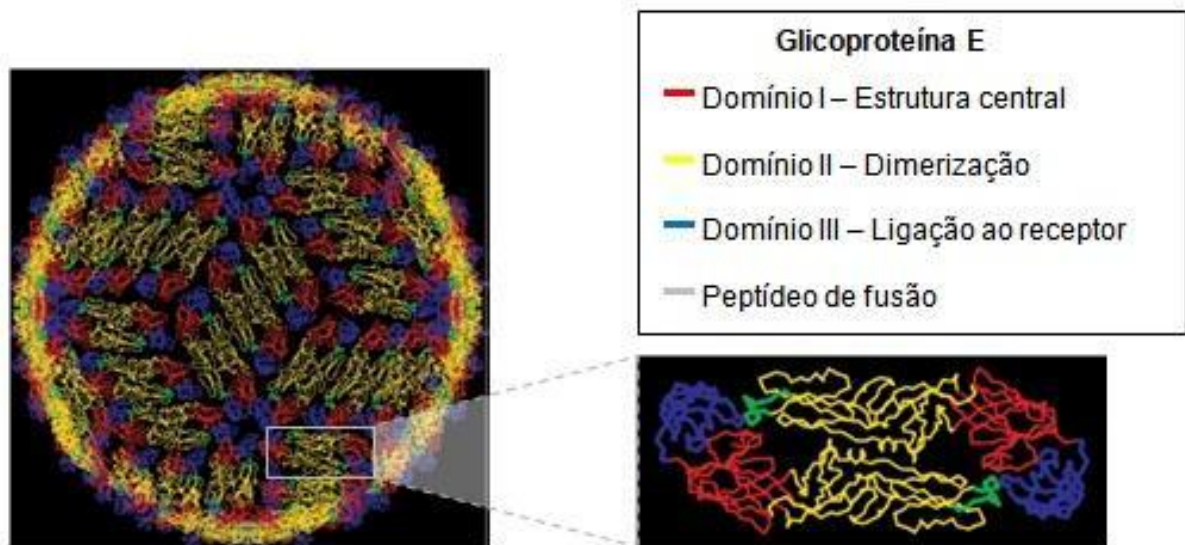
Fonte: (Adaptada de ASSENBERG *et al.*, 2009).

As proteínas estruturais são responsáveis pela formação da estrutura interna da partícula viral. A proteína C, de aproximadamente 11 kDa, extremamente básica, é um componente estrutural do nucleocapsídeo. A distribuição assimétrica de cargas positivas na superfície sugere que a montagem do vírus ocorre através da interação da proteína C com a membrana lipídica, através da região central hidrofóbica permitindo sua interação com RNA viral (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2004).

A glicoproteína prM, de aproximadamente 26 kDa, está presente na partícula DENV imaturos. A prM funciona como uma chaperona estabilizando o domínio II da proteína E, impedindo que ocorra mudanças conformacionais no transporte da partícula viral pelo complexo de Golgi. A prM é proteoliticamente clivada pela protease celular furina para formar a proteína de membrana M (8 kDa) em vírions maduros (MURRELL; WU; BUTLER, 2011; CHAMBERS *et al.*, 1990).

A proteína E, de aproximadamente 53 kDa, é a maior proteína estrutural dos vírions, desempenhando um papel em numerosas atividades biológicas do vírus. A proteína é formada por um dímero e cada monômero possui três domínios. O domínio I que é a estrutura central; o domínio II que contém a região de dimerização e o peptídeo de fusão; o domínio III consiste em uma dobra semelhante à imunoglobulina, sendo responsável pela ligação ao receptor (Figura 8) (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015; MURPHY; WHITEHEAD, 2011; HALSTEAD *et al.*, 2005). Além disso, a proteína E possui importante função indutora de resposta imune.

Figura 8 - Monômero da glicoproteína E e seus domínios



Legenda: Estrutura do DENV maduro. A proteína E se organiza em três dímeros paralelos de proteína, seus diferentes domínios estão representados por diferentes cores (domínios I, II e III estão coloridos em vermelho, amarelo e azul, respectivamente) e o peptídeo de fusão aparece em verde.
 Fonte:(Adaptada de MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

As proteínas não estruturais são essenciais para replicação viral. A NS1 é uma glicoproteína com peso molecular entre 46 e 55 kDa dependendo do seu estado de glicosilação. Esta proteína pode ser encontrada em várias formas oligoméricas e diferentes localizações celulares: associada à membrana celular (mNS1) em compartimentos vesiculares dentro da célula ou na superfície celular e secretada para meio extracelular na forma de hexâmero (sNS1), sendo detectada no soro de indivíduos na fase aguda da infecção (MULLER; YOUNG, 2013). Estudos sugerem que a proteína NS1 desempenha um papel essencial como cofator na replicação do vírus (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996).

A NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas e pouco é descrito sobre suas funções. As regiões hidrofóbicas dessas proteínas sugerem que estão associadas à membrana. A proteína NS2A de aproximadamente 22 kDa está envolvida na coordenação da mudança entre o empacotamento e a replicação do RNA (WEAVER; VASILAKIS, 2009). A NS2B (14 kDa) funciona como um cofator da protease viral, formando um complexo NS3-NS2B responsável pela clivagem da poliproteína viral (ZEIDLER *et al.* 2017, CHAMBERS *et al.*, 1990). As proteínas NS4A e NS4B podem estar envolvidas no bloqueio da resposta de Interferon tipo I (IFN I). A NS4A funciona como uma âncora da replicase viral à membrana celular (PERERA;

KUHN, 2008). Estudos sugerem que a NS4B modula a replicação do vírus da dengue através de sua interação com NS3 (UMAREDDY *et al.*, 2006).

A proteína NS3 (69 KDa) é altamente conservada e possui aproximadamente 618 aminoácidos(aa), sendo uma proteína multifuncional. Essa proteína tem um domínio de protease na região N-terminal, com 180 aa, que associados à proteína NS2B (co-fator) apresentam atividade serino-protease. A região C-terminal possui atividades de helicase, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA 5' trifosfatase (RTPase) que participam da replicação do material genético viral (LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015).

A proteína NS5 (103 kDa) é a maior das proteínas não estruturais, altamente conservada entre todos os *Flavivirus*, com atividades metiltransferase (MTase) e RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). Na região N-terminal é encontrada MTase dependente de S-adenosilmetionina, responsável pela adição *cap* e metilação da extremidade 5' *cap* do RNA viral. Na região C-terminal é encontrada RpRd responsável pela replicação e transcrição do genoma viral (POTISOPON *et al.*, 2014; NOMAGUCHI *et al.*, 2003). A NS5 também está envolvida no bloqueio da sinalização de IFN tipo I (LAURENT-ROLLE *et al.*, 2014).

1.5 Ciclo replicativo

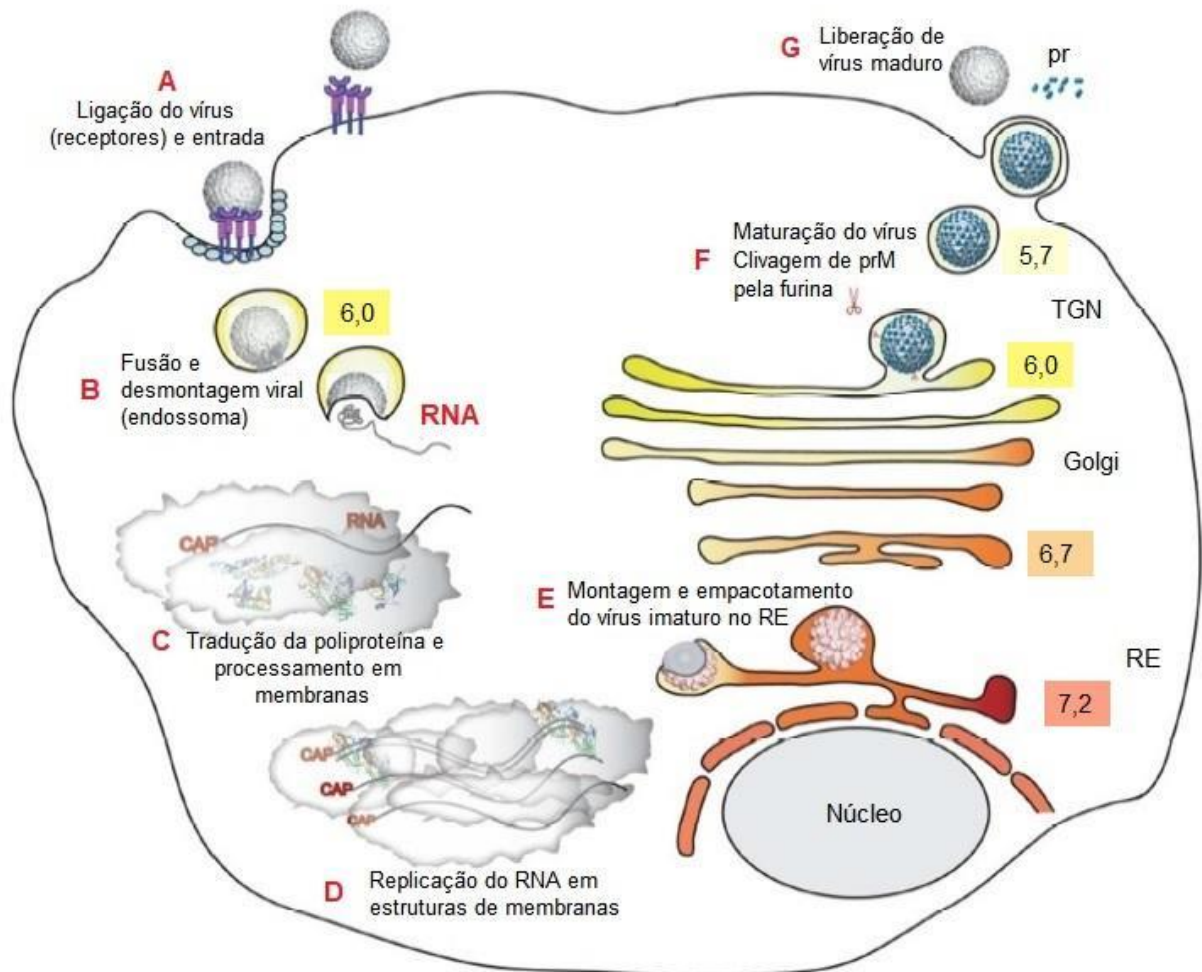
O DENV entra nas células hospedeiras através de endocitose mediada pela proteína citoplasmática clatrina, via interação entre glicoproteína da superfície viral e receptores específicos de superfície celular (VAN DER SCHAAR *et al.*, 2007). Vários supostos receptores têm sido identificados em células humanas incluindo o heparan sulfato, proteínas do choque térmico (Hsp70 e Hsp90), chaperonina GRP78/Bip, o receptor de lipopolissacarídeo CD14, receptor de laminina, DC-SING (do inglês: DC (*dendritic cell*) – *specific intercellular adhesion molecule 3 – grabbing nonintegrating*), entre outros (GUZMAN; HARRIS, 2015; CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015). Entretanto o receptor DC-SING serve como um fator de fixação do vírus da dengue em células dendríticas imaturas, responsável por mediar à entrada do vírus (GUZMAN; HARRIS, 2015; LOZACH *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que durante as infecções naturais, fagócitos mononucleares, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas são consideradas alvos principais da infecção por DENV (WU *et al.*, 2000). Assim como

os hepatócitos, linfócitos, células endoteliais, neuronais e de Langerhans, também como alvos para a replicação viral (PAES *et al.*, 2009).

Após a internalização do DENV por endocitose, o pH ácido desencadeia mudanças conformacionais na glicoproteína E, que permitem a fusão das membranas do endossomo e do envelope viral, liberando o RNA viral no citoplasma (GREEN *et al.*, 2014). O RNA é traduzido e replicado no retículo endoplasmático (RE), ocorrendo à montagem de novas partículas virais. Estas partículas imaturas são transportadas através da via secretória do Complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da prM pela furina resultando na formação vírions maduros. Posteriormente, as partículas maduras são liberadas por exocitose para meio extracelular, podendo infectar novas células (Figura 9) (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

Figura 9 - Ciclo replicativo do vírus da dengue



Legenda: Esquema representativo do ciclo de replicação do DENV em uma célula susceptível. A) Interação do vírion com a superfície celular por meio de receptores, seguido de endocitose. B) A acidificação do endossoma promove a mudança conformacional da proteína E que ocasiona na exposição do peptídeo de fusão levando à fusão das membranas do endossoma e do envelope viral, liberando o RNA viral no citoplasma. C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína processada por proteases celulares e virais. D) As proteínas virais não estruturais replicam o RNA genômico. E) Montagem de partículas virais imaturas, que adquirem o envelope por brotamento nas membranas do RE. F) Transporte da partícula viral imatura pelas membranas do Golgi e clivagem de prM pela protease furina nas cisternas do Trans-Golgi (TGN). G) Liberação da partícula madura por exocitose para o meio extracelular. Os números mostrados nas caixas coloridas indicam o pH dos compartimentos celulares. Fonte: (Adaptada de PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

1.6 Sintomatologia da dengue

A dengue apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que pode variar de acordo com a gravidade e a idade dos pacientes infectados. A infecção pode ser causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais que pode ser assintomática ou febre da dengue (FD) ou as formas mais graves da doença, febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque por dengue (SCD) (HADINEGORO, 2012). Os

quadros de dengue se iniciam logo após o período de incubação, em média, quatro a oito dias após a picada do mosquito infectado (GUZMAN; HARRIS, 2015).

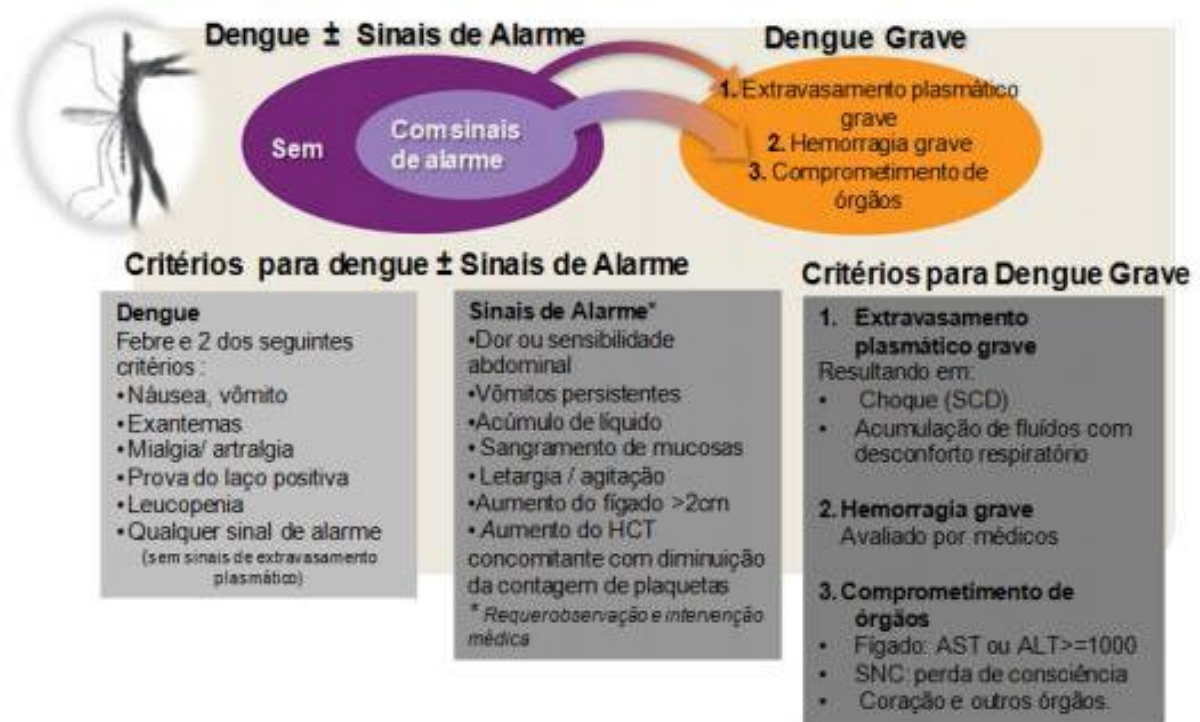
A FD é caracterizada por febre alta, dores de cabeça frontal, retro orbital, muscular e articular, náuseas, vômitos e erupções cutâneas. O período febril da FD tem duração de aproximadamente cinco a sete dias e pode deixar o paciente com fadiga severa por vários outros dias (RIGAU-PEREZ, 1998).

Na FHD os primeiros sintomas se assemelham aos da FD, até que ocorra a defervescência da febre, entre o 3º e o 7º dia, com o aparecimento de manifestações hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular resultando no extravasamento do plasma, hemoconcentração (aumento de $\geq 20\%$ do hematócrito) e trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior a 100.000 células/mm³). O período crítico dura de 24 a 48 horas que pode levar ao choque (SCD) e risco de óbito do paciente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019; HADINEGORO, 2012; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014b).

Em 1997, a OMS categorizou FHD em quatro graus de acordo com a gravidade, sendo os graus III e IV classificados como SCD. A presença de trombocitopenia com hemoconcentração diferencia os graus I e II FHD da FD (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997; BALMASEDA *et al.*, 2005).

Com o objetivo de melhorar a triagem e realizar o tratamento adequado na classificação clínica da dengue, com diagnóstico precoce do paciente, a OMS sugeriu uma nova classificação para os casos de dengue (TSAI *et al.*, 2013). Em 2009, os critérios da OMS classificavam a dengue de acordo com os níveis de gravidade: dengue com e sem sinais de alertas e dengue severa (Figura 10) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; HADINEGORO, 2012). Vários resultados de estudos demonstraram maior sensibilidade para identificação de casos graves com a classificação revisada (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Figura 10 - Classificação clínica dos casos de dengue de acordo com OMS, 2009



Legenda: A classificação de 2009 para casos de dengue, com ou sem sinais de alarme (círculo roxo), e dengue grave (círculo laranja). Manifestações clínicas (retângulos) observadas em cada grupo. Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.7 Resposta imunológica inata

O DENV se propaga entre humanos através de mosquitos infectados. Uma grande variedade de células mostraram-se sensíveis à infecção por DENV em experimentos *in vitro*, dentre elas, células epiteliais, células endoteliais, hepatócitos, células musculares, células dendríticas (DCs – *dendritic cells*), monócitos e mastócitos. Contudo, em modelos *in vivo* células do sistema imune mostraram-se os principais alvos de infecção por DENV (AREVALO *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 2011; PAES *et al.*, 2009).

Assim, durante uma infecção natural pelo vírus da dengue, humanos são picados por um mosquito infectado que libera o vírus na pele do hospedeiro. Dessa forma, o DENV irá infectar e se replicar nas células de linhagem mononuclear presentes na pele, como monócitos, DCs, macrófagos e células de Langerhans (JESSIE *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2000). Essas células, quando expostas ao DENV produzirão citocinas antivirais e pro-inflamatórias, como os interferons (IFN) do tipo I, e quimiocinas, como o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF – *migration*

inhibition factor), proteína quimiotática de monócitos (MCP – *monocyte chemotactic factor*) e interleucina (IL- *interleukin*) 8 (LIBRATY *et al.*, 2001; MAROVICH *et al.*, 2001; CHUANG *et al.*, 2011). Essa resposta inicial e focal não é responsável pelos sintomas clínicos, contudo, desempenha um papel importante em regular a replicação e disseminação viral, ao recrutar células susceptíveis para o local de inoculação do vírus. Ainda, a infecção de DCs pelo DENV induz a produção de metaloproteinases, como MMP-2 (*matrix metalloproteinase-2*) e MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*), que modulam a matriz extracelular e facilitam a migração dessas DCs para linfonodos locais, onde o vírus irá se replicar e, subsequentemente, entrar na circulação sanguínea, alcançando outros órgãos, como fígado, pulmões e baço, gerando uma infecção sistêmica (LUPLERTLOP *et al.*, 2006).

A infecção desencadeia uma variedade de respostas da imunidade inata do hospedeiro. As células da imunidade inata são as primeiras a responder à infecção, utilizando os receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *pattern recognition receptor*) para identificar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) e montando uma resposta efetora (LOO; GALE, 2011; AKIRA; TAKEDA, 2004). Dentre essas células estão as DCs, os macrófagos e os monócitos.

Alguns dos PRRs associados à infecção pelo DENV são o gene I indutor de ácido retinóico (RIG-I) e o gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) que se encontram no compartimento citoplasmático e os receptores TLR3 (*Toll-like receptor 3*) e TLR7 (*Toll-like receptor 7*) que encontram-se no compartimento endossomal (NASIRUDEEN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2006). A ativação desses receptores pelo reconhecimento do DENV leva à uma resposta mediada por IFN do tipo I.

Os receptores RIG-I e MDA5 são receptores da família *RIG-I-like receptors* (RLRs), localizados no citoplasma de uma variedade de células, incluindo células mielóides, epiteliais, e células do sistema nervoso central. Esses receptores são capazes de detectar fitas de RNA contendo um grupamento fosfato e longos dsRNA (RNAs de dupla fita) presentes no citoplasma (LOO; GALE, 2011). Assim, eles são essenciais na resposta imunológica das células da imunidade inata contra infecções virais, identificando a replicação do vírus no citoplasma dessas células. Após sua ativação, esses receptores podem levar a ativação dos fatores reguladores de IFN, IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) e IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*), que induzem a produção de IFNs do tipo I (SETH *et al.*, 2005). O receptor TLR3 é o

principal receptor da família TLR na resposta ao DENV, sendo capaz de reconhecer dsRNA nos compartimentos endossomais (BAUM; GARCÍA-SASTRE, 2010). Sua ativação induz a ativação dos genes estimulados por interferons (ISGs do inglês: *interferon stimulated genes*) e produção de quimiocinas (AKIRA; TAKEDA, 2004). Já TLR7 reconhece ssRNA (RNA de fita simples) no compartimento endossomal de DCs (SETH *et al.*, 2005). O reconhecimento desses RNAs, que podem incluir fragmentos do genoma do DENV, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B – *nuclear factor- κ B*) (WANG *et al.*, 2006).

A produção de IFNs do tipo I inibe a infecção de outros monócitos pelo DENV. Essas citocinas ligam-se aos receptores IFN α/β (IFNARs), presentes na superfície dessas células, levando a ativação da via molecular JAK/STAT (*Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT)*) promovendo a ativação dos ISGs, o que resulta na promoção de um estado celular antiviral (MORRISON; GARCÍA-SASTRE, 2014). Assim, a ativação dos PRRs e a intensa produção de IFN do tipo I resultam na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - *tumor necrosis factor- α*), IL-6, IL-8, e IL-12, além da manutenção da resposta antiviral (AKIRA, 2006; CHEN; NG; CHU, 2015).

A fase febril da dengue é caracterizada por altos níveis de DENV ou de proteína NS1 solúvel no sangue, além de níveis elevados de IFN do tipo I (LIBRATY *et al.*, 2002). Células dendríticas plasmocitóides (PDCs), uma população específica de DCs, e grandes produtoras de IFN do tipo I, encontram-se ativadas e circulantes durante a infecção pelo DENV, sendo encontradas em níveis menores em pacientes com FHD (PICHYANGKUL *et al.*, 2003).

Contudo, algumas respostas imunológicas parecem estar associadas com quadros clínicos mais severos. O reconhecimento de NS1 por receptores TLR4 leva a produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o dano vascular observado em manifestações mais graves (MODHIRAN *et al.*, 2015). A proteína NS1 também promove uma exacerbação da doença ao ligar-se em alguns tipos celulares iniciando o processo de extravasamento vascular (AVIRUTNAN *et al.*, 2006). Além disso, uma ativação da via alternativa do sistema complemento pode estar associada com quadros mais graves da doença (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

O endotélio vascular desempenha um papel central na fisiopatologia da dengue. A expressão de IL-6, IL-8 e TNF α está envolvida com a ativação de células

endoteliais (VERVAEKE; VERMEIRE; LIEKENS, 2015; HUANG *et al.*, 2000). Essa ativação não só parece estar envolvida no sangramento identificado em pacientes com FD e FHD, mas também aos danos observados no fígado de pacientes que progrediram para hepatite em decorrência da infecção (THANACHARTWET *et al.*, 2015; SAMANTA; SHARMA, 2015). A IL-8 encontra-se expressa em hepatócitos durante a infecção por dengue, com correlação entre os níveis de expressão dessa citocina e a elevação dos níveis das enzimas transaminases (MEDIN; FITZGERALD; ROTHMAN, 2005; RAGHUPATHY *et al.*, 1998). A expressão de TNF α parece preceder a apoptose de células hepáticas durante a infecção, sendo reportado uma correlação entre gravidade da doença e níveis de IL-6 e TNF α (NAGILA *et al.*, 2013; SEHRAWAT *et al.*, 2018).

Foi observado, que NS1 pode estimular modificações patogênicas importantes em células endoteliais. A internalização de NS1 por células endoteliais é capaz de induzir a ativação de mais de 200 genes, muitos ligados às funções endoteliais e essa ativação pode promover uma redução na integridade da barreira endotelial (BARBACHANO-GUERRERO; ENDY; KING, 2020). Por fim, a proteína NS1 pode direcionar a resposta do sistema complemento contra células endoteliais, levando a apoptose dessas células e interromper a cascata de coagulação (AMORIM *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2012). Os receptores TLR2 e TLR6 são ativados, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, exacerbando o processo de extravasamento plasmático (CHEN; NG; CHU, 2015).

O sistema complemento constitui um importante componente nas respostas imunológicas desempenhadas pelo sistema imune inato contra vírus. As lectinas ligantes de manose (MBL - *mannose binding lectin*), da via das lectinas do complemento, é capaz de induzir proteção contra o DENV. O MBL consegue ligar-se às superfícies contendo glicanos de manose, como a superfície do DENV, reconhecendo o vírion (AVIRUTNAN *et al.*, 2011). Esse reconhecimento pelo complexo MBL irá induzir a clivagem dos componentes C4 e C2 da via, levando à formação e depósito dos fragmentos C4b e C2a na superfície do vírion, formando a C3 convertase (THIEL *et al.*, 1997). A partir disso, a cascata de ativação segue igual à da via clássica do complemento, que inclui a formação do complexo C5 convertase, consequentemente, do complexo de ataque à membrana (MAC), composto pelos fragmentos de C5b-9, que induz a lise do vírion ou de células infectadas, o recrutamento de fagócitos e inflamação (FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004).

Como visto, as células dendríticas (DCs) aparecem dentre as primeiras células imunológicas a encontrarem o vírus após o início da infecção. Após esse encontro, as DCs produzem e liberam uma série de sinais, dentre esses, sinais mediados por IFN tipo I e TNF- α , capazes de recrutar células NK (*natural killers*) para o local de infecção, resultando numa atividade antiviral citotóxica mediada por perforinas/ granzimas, Fas/ FasL e produção de interferon gama (IFN γ) (COSTA *et al.*, 2017).

Células NK desempenham papel importante na resposta contra vírus, produzindo citocinas antivirais, secretando grânulos citotóxicos e desencadeando a via de FAS/TRAIL, que levam a indução de apoptose de células infectadas e conseguem controlar a replicação viral (JOST; ALTFELD, 2013). As células NK apresentam grande capacidade de lisar células infectadas pelo DENV (KURANE *et al.*, 1984).

Células NKT invariantes, ou iNKT, uma população específica de células T, similares à células NK, também são ativadas durante a infecção pelo vírus da dengue e sua atividade pode estar relacionada com a gravidade da doença (MATANGKASOMBUT *et al.*, 2014). Essas células são potentes produtoras de citocinas, como IFN γ e IL-4 e o recrutamento dessas células pode estar associado com a ativação de mastócitos locais, demonstrando ser importante no controle local do vírus (JUNO; KEYNAN; FOWKE, 2012; St JOHN *et al.*, 2011).

A atividade citotóxica mediada por células NK proporciona importante efeito antiviral, contudo, ao mesmo tempo, é capaz de mediar danos aos tecidos adjacentes. Assim, ainda não está claro se um aumento na resposta das células NK pode contribuir para um aumento na gravidade da doença. A inibição dessas células pela proteína NS1 parece estar associado com o desenvolvimento de FHD (TOWNSLEY *et al.*, 2015). Além disso, amostras de crianças que desenvolveram infecções mais severas mostraram frequências maiores de células NK ativadas quando comparadas com crianças que tiveram infecções leves, sugerindo que as células NK estão envolvidas ativamente na defesa do hospedeiro contra o vírus (GREEN *et al.*, 1999; MATHEW, 2018).

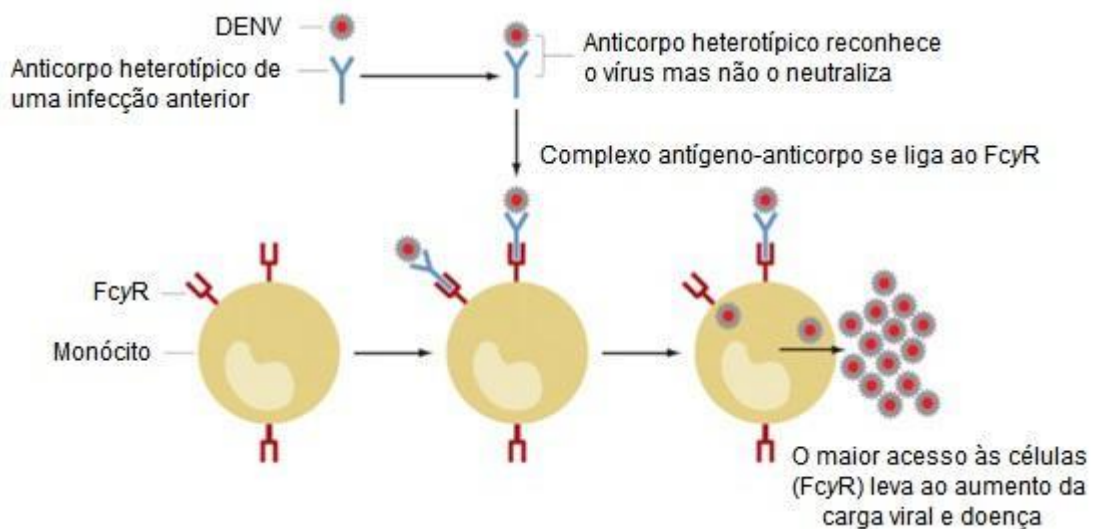
1.8 Mecanismos Imunológicos na FHD

A infecção primária com DENV leva a indução de anticorpos neutralizantes de longa duração, sendo interpretado como imunidade duradoura contra a doença após

nova infecção com o mesmo sorotipo (imunidade homotípica) (LAOPRASOPWATTANA *et al.*, 2007). A infecção secundária ocorre quando um indivíduo é infectado por um sorotipo heterólogo ao da infecção primária, podendo levar ao desenvolvimento de quadros graves da doença. Há pelo menos quatro Teoria que tentam explicar as alterações que desencadeiam o fenômeno da FHD.

Uma das teorias propostas para explicar o aumento do risco de doença grave em casos secundários é infecção sequencial ou facilitação dependente de anticorpo (do inglês: ADE – *antibody-dependent enhancement*) (WAHALA; SILVA, 2011, HALSTEAD *et al.*, 2010). ADE ocorre quando o anticorpo heterotípico não neutralizante presente no hospedeiro devido a uma infecção anterior DENV, liga-se ao vírus durante a infecção heterotípica subsequente, sem neutralizá-lo, formando um complexo imune, vírus-anticorpo. Esse complexo se liga ao receptor Fcγ (FcγR) presente na superfície de células como monócitos, macrófagos e células dendríticas, facilitando a infecção e replicação viral (Figura 11) (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; HALSTEAD, 1988).

Figura 11 - Figura esquemática do mecanismo de aumento dependente de anticorpo (ADE)



Legenda: Interação do DENV com anticorpos não neutralizantes e posterior facilitação da entrada do vírus em células com receptores Fc (ADE).

Fonte: (Adaptada de MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

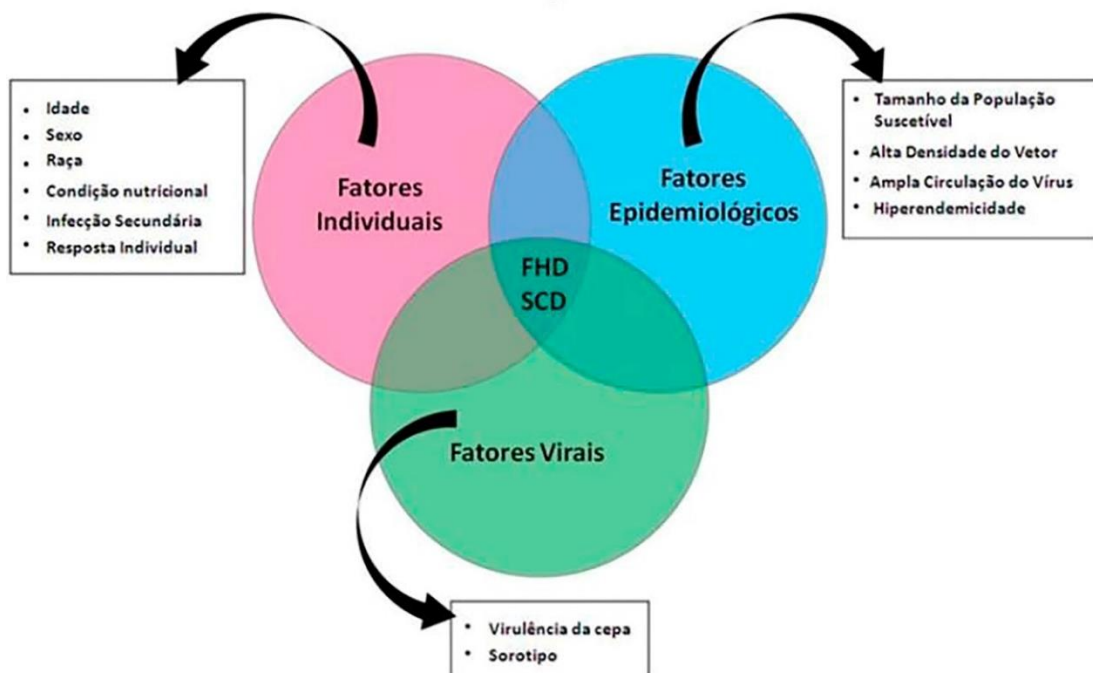
Em 1977, a teoria de Rosen relacionou a ocorrência de FHD com a virulência da cepa infectante, de modo que as formas mais graves da doença sejam resultantes das diversidades genéticas e antigênicas das diferentes cepas do vírus

(ROSEN, 1977). A evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo pode dar origem a cepas epidêmicas ou mais virulentas (GUBLER, 1998; RICO-HESSE, 1990).

Outra hipótese visando explicar FHD, foi denominada como a teoria do Pecado Antigênico Original. Esta baseia-se no fato de quando uma infecção secundária por sorotipo distinto do DENV ocorre, há ativação de linfócitos T de memória, gerados após uma infecção primária heteróloga, porém estas células apresentariam uma baixa avidéz para o sorotipo secundário resultando em resposta funcional fraca (MATHEW; ROTHMAN, 2008). Como consequência, essas células T de memória de reatividade cruzada produziriam concentrações elevadas de citocinas inflamatórias e pode assim contribuir para o aumento da permeabilidade vascular (RIVINO, 2016).

Uma teoria que foi sugerida em 1987, por pesquisadores cubanos, foi a Teoria Integral de Multicausalidade. Esta baseia-se nos dados da epidemia de FHD que ocorreu em Cuba (1981), onde observaram que a interação de vários fatores de riscos - individual (idade, sexo, raça, estado nutricional, presença de anticorpos), epidemiológico e viral - estariam relacionados ao desenvolvimento de FHD (Figura 12) (KOURI; GUZMAN; BRAVO, 1987; GUZMAN; KOURI, 2002).

Figura 12 - Teoria Integral de Multicausalidade



Legenda: Os conjuntos representam os diferentes fatores apontados na teoria integral de multicausalidade. O círculo rosa contempla os fatores individuais inerentes aos indivíduos. No círculo azul estão contemplados os fatores epidemiológicos. Já, no círculo verde os fatores virais. A intercessão dos três conjuntos está ligada ao desenvolvimento de FHD ou SCD.

Fonte: (Adaptada de GUZMAN; KOURI, 2002).

Um mecanismo complementar para aumento da viremia também pode estar relacionado a supressão de determinados componentes da resposta imune antiviral, como IFN do tipo 1 e os efetores antivirais induzidos por esta citocina (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010). Alguns estudos *in vitro* mostram que a infecção de células THP1 (linhagem celular monocítica) pelo vírus da Dengue, leva a supressão da transcrição e produção de IL-12, IFN γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e óxido nítrico (NO), que são conhecidos mediadores pró-inflamatórios, mas aumentam a produção de citocinas IL-6 e IL-10, que por sua vez são consideradas citocinas com efeito anti-inflamatório. Isto sugere um mecanismo de escape do vírus (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; GUZMAN; VAZQUEZ, 2010).

Frente a possibilidade de uma infecção secundária levar o indivíduo a um quadro de FHD ou SCD, percebeu-se a necessidade de um desenvolvimento de uma vacina tetravalente que estimule uma resposta imune equilibrada contra os quatro sorotipos do DENV e com isso possa evitar os fenômenos citados acima (GUZMAN; HARRIS, 2015).

1.9 Vacinas

A história da humanidade é marcada por epidemias, pandemias e tentativas do homem em desenvolver um método para se tornar mais resistente às doenças infecciosas. Visando este objetivo, desde o século XVII, já eram relatados procedimentos de inoculação de crostas em pó ou o líquido das pústulas de pacientes com varíola em arranhões superficiais de indivíduos saudáveis, a fim de torná-los mais resistentes a uma posterior infecção pelo vírus. Este procedimento, que ficou conhecido como “variolação”, se popularizou em muitos países na Ásia, Oriente Médio, África e Europa, chegando a ser regulamentado em algumas regiões (HAN, 2015).

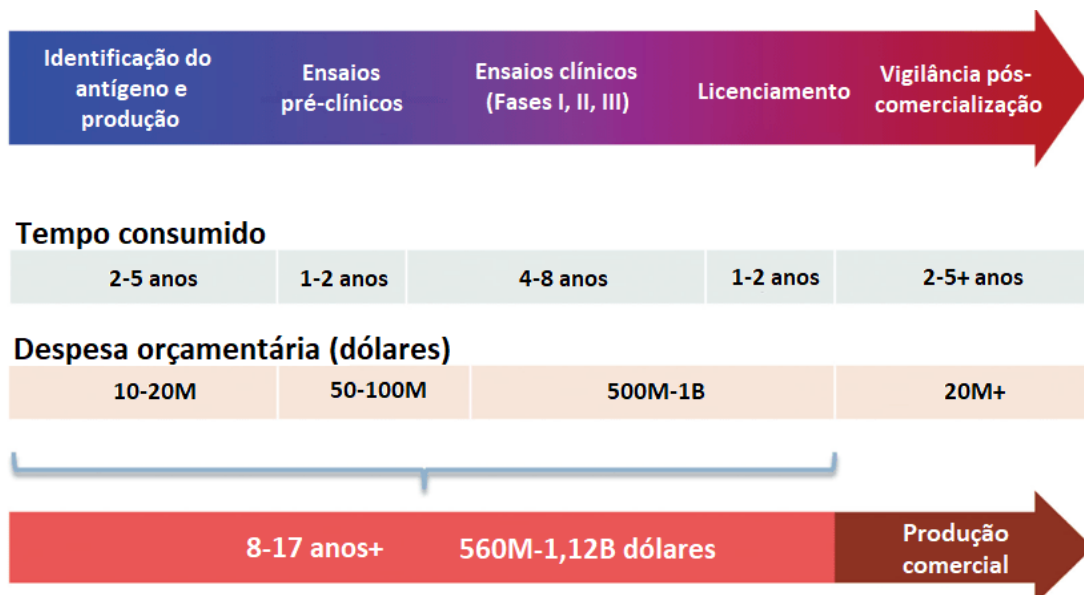
Nos séculos seguintes, houve grandes avanços no desenvolvimento de vacinas, culminando com a erradicação da varíola e o controle de muitas doenças infecciosas, como a poliomielite e o sarampo. A partir do século XX, as vacinas deixaram de ser desenvolvidas empiricamente e passaram a ser desenvolvidas partindo de uma hipótese imunológica sobre a proteção (PLOTKIN; PLOTKIN, 2011).

O século XXI é marcado pelo acúmulo de conhecimento multidisciplinar e grandes investimentos aplicados ao desenvolvimento de vacinas. Isto associado às melhorias científicas e a nossa experiência histórica tornam a era moderna a mais bem-sucedida e produtiva da história (HAN, 2015).

Cada vacina segue um caminho de desenvolvimento único, dependendo de características como: epidemiologia da doença, tipo de vacina a ser desenvolvida, identificação da dose e via de administração, população alvo e seus fatores socioculturais, disponibilidade de uma vacina pré-existente com um perfil risco-benefício satisfatório, planos para induzir a imunidade do rebanho, avaliação de risco da doença e da própria vacina, benefícios para a saúde pública, chances de aceitação pela comunidade, custo-benefício, desafios de fabricação e licenciamento, além de estratégias regulatórias (HAN, 2015; SINGH; MEHTA, 2016).

O processo de desenvolvimento de vacinas continua sendo aprimorado, visando à obtenção de vacinas cada vez mais seguras e eficazes. Para isso, atualmente, todo o processo leva em torno de 10 a 15 anos e requer um orçamento de cerca de um bilhão de dólares, compreendendo, basicamente, cinco fases, conforme apresentado na Figura 13 (HAN, 2015).

Figura 13 - Fluxograma com as fases desenvolvimento da vacina



Legenda: Esquema com o custo e tempo médio da execução de cada fase necessária do desenvolvimento a comercialização de vacinas.

Fonte: (Adaptado de HAN, 2015).

A complexidade e diversidade desses novos produtos apresentam desafios científicos e regulatórios (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). As agências reguladoras dividem o processo de desenvolvimento de vacinas em dois estágios: pré-clínicos e clínicos, a fim de garantir a segurança, imunogenicidade e eficácia protetora em humanos antes do produto ser licenciado para o uso (SINGH; MEHTA, 2016).

Os ensaios pré-clínicos ou não clínicos são pré-requisitos para que a vacina candidata siga o processo de desenvolvimento para os ensaios clínicos. As principais preocupações de segurança estão relacionadas à toxicidade do produto, de impurezas e contaminantes e de interações dos componentes da vacina presentes na formulação, e aos efeitos colaterais, associados à resposta imune induzida pela vacina. O objetivo desses ensaios é identificar possíveis riscos para os vacinados, além de auxiliar no planejamento de protocolos para estudos clínicos subsequentes em seres humanos. Essa etapa compreende todos os testes *in vitro* e *in vivo* em animais realizados antes e durante o desenvolvimento clínico de vacinas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

Os ensaios clínicos devem caracterizar a imunogenicidade e determinar a eficácia, efetividade e segurança do novo produto. São classificados em ensaios de pré-licenciamento e de pós-licenciamento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017d). Os ensaios de pré-licenciamento estão dispostos em três fases: I, II e III, cuja progressão é sequencial. Já os ensaios de pós-licenciamento, também chamados de estudos de vigilância pós-comercialização, correspondem à fase IV (SINGH; MEHTA, 2016).

A fase I é o primeiro estudo em seres humanos realizado em pequeno grupo de indivíduos sadios (20 – 80 voluntários) para avaliar principalmente a segurança. Frequentemente, a dose, o esquema de imunização e o modo de administração da vacina também são avaliados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008; OMS 2017d).

Os ensaios de fase II são realizados em um grupo maior de pessoas (geralmente entre 200 e 500) e geralmente são randomizados e bem controlados. Os ensaios têm como objetivo demonstrar o perfil de imunogenicidade e segurança de uma vacina candidata. Nesta fase iniciam os estudos de dose resposta e vias de administração (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017d).

Os ensaios de fase III complementam os resultados anteriores, fornecendo evidências clínicas e estatísticas mais robustas em apoio ao licenciamento (SINGH; MEHTA, 2016). São ensaios clínicos de larga escala, envolvendo milhares de indivíduos da população-alvo (3000 a 4000), sendo obrigatoriamente randomizado, duplo-cego e controlado com placebo. O objetivo principal é avaliar a eficácia e segurança da formulação final da vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

Os ensaios de fase IV também são chamados de ensaios clínicos de pós-licenciamento e/ou de vigilância pós-comercialização, pois são realizados após a comercialização do produto, a fim de monitorar a segurança da vacina em uso rotineiro e tratar de questões específicas de segurança que foram identificadas como preocupações potenciais de testes pré-licenciamento. Os produtores podem optar por realizar ensaios adicionais para estender ou modificar o uso da vacina (SINGH; MEHTA, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017d).

1.9.1 Vacina da dengue

A vacina ideal contra dengue deve proteger para cada um dos quatro sorotipos do DENV, fornecer proteção de longa duração, a imunização deve ser segura e bem tolerada, não induzir o fenômeno ADE e o custo da vacina deve ser acessível à população (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

Diversas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina eficaz estão sendo utilizadas, incluindo as vacinas de vírus atenuado e inativado, proteínas recombinantes, vacina de vetor viral e vacina de DNA (WODI; MORELLI, 2015; DENG *et al.* 2020). As vacinas funcionam principalmente aumentando as respostas imunes contra a proteína de envelope (E) do DENV e a proteína não estrutural -1 (NS1) (LIU; CHENG, 2016).

Até o momento, a vacina tetravalente contra dengue da Sanofi Pasteur é a única registrada no Brasil, mas existem várias outras vacinas tetravalentes candidatas em desenvolvimento pré-clínico e clínico (Tabela 1) .

Tabela 1 - Vacinas Tetravalentes contra dengue

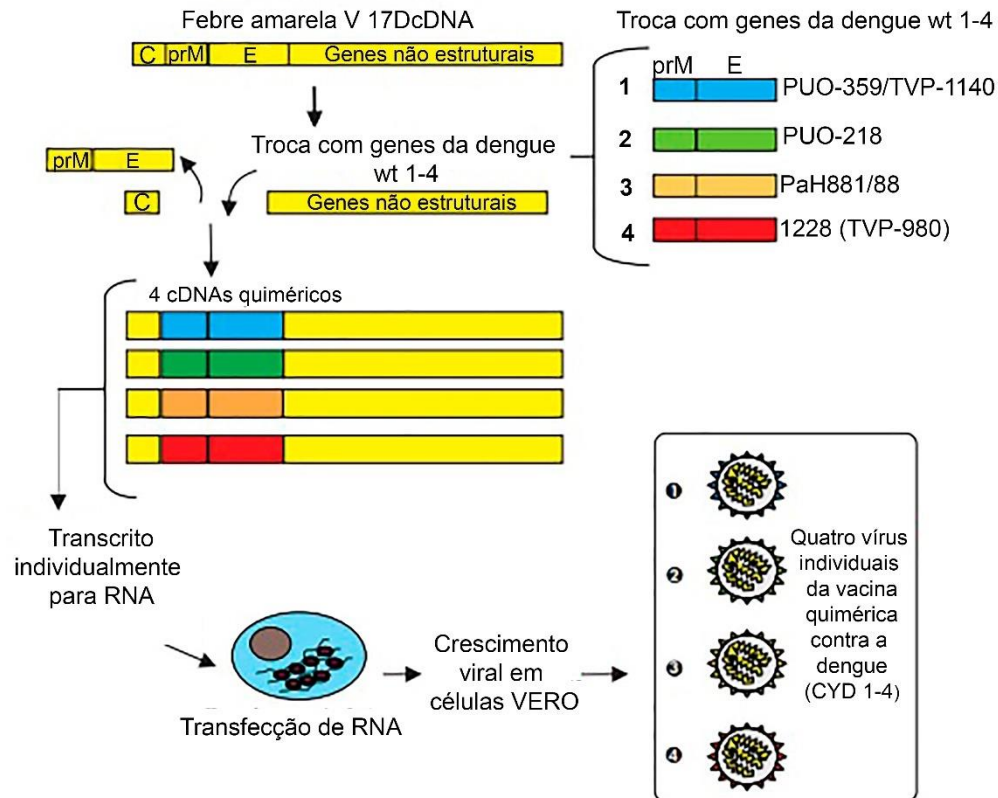
Vacina Tetravalente	Produtor	Tipo da Vacina	Descrição da Vacina	Fase Clínica
Dengvaxia	Sanofi Pasteur	Vírus atenuado quiméricos	Genes prM e E dos quatro sorotipos do vírus da dengue inseridos em uma porção não-estrutural do vírus vacinal da febre amarela 17D.	Concluída
DENVax	Takeda	Vírus atenuado	Cepa atenuada DENV2 por passagem seriada em linhagem de células primárias de rim de cachorro e ainda mais atenuada pela mutação no gene NS3	III
TV003/ TV005	NIH e Instituto Butantan	Vírus atenuado	Mutações genéticas com cepas selvagem	III
TDENV PIV	GSK e Walter Reed Army Institute of Research	Vírus inativado purificado	Inativação por formalina de todos sorotipos	II
V180	Merck	Proteína recombinante	Proteínas do envelope produzidas em células de <i>Drosophila</i>	I
TVDV	Naval Medical Research Center	DNA	Proteínas do envelope e da pré-membrana do DENV1 expressas sob o controle do promotor-potencializador do citomegalovírus humano	I

Fonte: (Adaptado de DENGUE VACCINE INITIATIVE, 2016).

A primeira vacina tetravalente contra a dengue, Dengvaxia® (CYD-VTD) produzida pela Sanofi Pasteur, foi registrada no Brasil, em dezembro de 2015. Essa vacina também foi aprovada por outras agências em vinte países distribuídos pela Ásia e América Latina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018; SWAMINATHAN; KHANNA, 2019).

A CYD-VTD é uma vacina tetravalente contra a dengue que contém vírus atenuado quiméricos e tem como base a cepa da vacina 17D contra a febre amarela (YF17D) (VILLAR *et al.*, 2015). Cada vírus que compõe a vacina da dengue foi construído através da substituição dos genes que codificam as proteínas do envelope (E) e da pré-membrana (prM) do vírus da vacina febre amarela (17D) pelos genes dos quatro diferentes tipos de vírus da dengue (GUY *et al.*, 2011, SCHWARTZ *et al.*, 2015) (Figura 14).

Figura 14 - Construção das quatro vacinas quiméricas produzidas pela Sanofi Pasteur



Legenda: Representação esquemática da confecção das partículas de vírus quiméricos a partir da substituição dos genes das proteínas E e prM do vírus da vacina febre amarela (17D) pelos do DENV (1-4). Crescimento viral em células VERO.

Fonte: (Adaptado de GUY *et al.*, 2011).

Nos estudos pré-clínicos são realizados os testes *in vitro* e *in vivo* para garantir que a vacina é estável fenotipicamente e genotipicamente, sendo avaliado o seu tropismo, estrutura, capacidade de multiplicação e risco de transmissão por mosquitos vetores.

Em testes *in vitro* para avaliar o efeito das cepas recombinantes da vacina Dengvaxia® em células dendríticas humanas, por ser uma das primeiras células a entrar em contato com o vírus e importantes apresentadoras de antígenos (GUY; SAVILLE; LANG, 2010), observou-se que essas cepas apresentam comportamento similar a infecção natural pelo DENV. Assim, foi demonstrado que os quatro sorotipos vacinais foram capazes de induzir a maturação dessas DCs e desencadear uma resposta imune desejada, como a produção de citocinas inflamatórias, expressão do IFN do tipo I e expressão de marcadores de DCs maduras (HLA-DR, CD80, CD86, CD83) (GUY *et al.*, 2011; DEAUVIEAU *et al.*, 2007). Além disso, estudos

demonstraram que os vírus CYD1-4 são menos hepatotrópicos do que o vírus da vacina YF17D em humanos (BRANDLER *et al.*, 2005).

Quanto a segurança e a eficácia da Dengvaxia®, esta mostrou-se bastante eficaz na prevenção da doença, especialmente em resposta aos ensaios clínicos de fases I, II, III, realizados com voluntários entre dois a sessenta anos de idade na Ásia e na América Latina. Dados desse estudo apontam algumas reações locais na aplicação da vacina, tal como dor, e reações adversas sistêmicas como dores de cabeça e mal-estar. Nenhuma reação anafilática relacionada à vacina, eventos neurotrópicos ou efeitos viscerotrópicos foram relatadas (GAILHARDOU *et al.*, 2016).

Durante o terceiro ano de acompanhamento dos indivíduos foi observado um risco maior de hospitalização por dengue no grupo de crianças menores de nove anos de idade que receberam a vacina Dengvaxia® (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Diante desta circunstância, foi ressaltado um risco maior no grupo de crianças nessa faixa etária, o que sugeriu a hipótese de que a vacina para este caso induziria a uma primo-infecção pelo vírus da dengue, proporcionando uma proteção de curto prazo após a administração da vacina a esse grupo, com perda de imunidade protetora ao longo do tempo (GAILHARDOU *et al.*, 2016).

Para população acima de nove anos de idade, a vacina apresentou uma eficácia de 65,6% para pessoas que nunca tiveram dengue, redução de 80,3% das hospitalizações e 93% contra casos graves da doença. No entanto, a eficácia nessa população quando analisada por sorotipo foi de: 58,4% contra o sorotipo 1; 47,1% contra o sorotipo 2; 73,6% contra o sorotipo 3 e de 83,2% contra o sorotipo 4 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015; HADINEGORO *et al.*, 2015).

Em 27 de novembro de 2017, a Sanofi Pasteur apresentou resultados de estudos adicionais, após cinco anos da administração da vacina, que permanece positivo o benefício da vacinação na população geral e em indivíduos previamente soropositivos. Entretanto para indivíduos previamente soronegativos, depois de 30 meses após a primeira dose da vacina, ocorre um aumento do risco de exacerbação da doença, com aumento de casos de dengue severa e hospitalização (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Com isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que a vacina Dengvaxia® não seja administrada em indivíduos soronegativos, ou seja,

que não tenham sido previamente infectados pelo vírus da dengue (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A vacina Dengvaxia® (uma dose – 0,5 mL) é composta por um pó liofilizado injetável e diluente de cloreto de sódio 0,4% para suspensão, contendo após sua reconstituição, o valor de potência de 4,5 – 6,0 log₁₀ DICC₅₀/dose (dose infectante de 50% da cultura de células) para os quatro sorotipos. O esquema vacinal é de três doses sendo a segunda e a terceira após 6 e 12 meses respectivamente para uso em indivíduos 9 - 45 anos de idade que vivem em áreas endêmicas, sendo contraindicado em gestantes e em pessoas com a imunidade comprometida (DENGUE VACCINE INITIATIVE, 2015; VANNICE; DURBIN; HOMBACH, 2016).

Atualmente, podemos destacar outras duas vacinas tetravalentes de vírus atenuado que se encontram na fase III de desenvolvimento. Uma produzida pela empresa farmacêutica Takeda (TDV ou TAK-003) e outra pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos Estados Unidos em parceria com o Instituto Butantan (TV003/TV005) (SWAMINATHAN; KHANNA, 2019).

A vacina contra dengue da Takeda (TAK-003) tem como base o vírus vivo atenuado do sorotipo 2 da dengue (DENV-2), que utiliza o “esqueleto” genético do sorotipo 2 adicionando os genes de interesse dos demais sorotipos (HUANG *et al.*, 2013). A cepa DENV-2 (TDV-2) foi atenuada por passagem seriada em linhagem de células primárias de rim de cachorro (PDK) - 53. As outras três cepas de vírus (TDV-1, TDV-3 e TDV-4) são quimeras que foram geradas pela substituição dos genes que codificam as proteínas de envelope (E) e pré-membrana (prM) do TDV-2 pelos genes do DENV-1, DENV-3 e DENV-4 (BISWAL *et al.*, 2019).

Os dados clínicos das fases I e II em crianças e adolescentes mostraram que TAK-003 induziu respostas imunes contra todos os quatro sorotipos de dengue, tanto nos participantes soropositivos quanto nos soronegativos, e a vacina mostrou-se segura e bem tolerada (TRICOU *et al.*, 2020).

O estudo de fase III duplo-cego, randomizado e controlado por placebo está avaliando a segurança e eficácia de duas doses de TAK-003 (3 meses de intervalo) envolvendo crianças e adolescentes de 4 a 16 anos, na Ásia e América Latina. Esse estudo será realizado em três etapas. A primeira etapa do estudo avaliará a segurança e eficácia da vacina por 15 e 12 meses após a primeira e segunda dose respectivamente. A segunda etapa será por seis meses adicionais para concluir avaliação de eficácia por sorotipo, sorologia basal e gravidade da doença. A etapa

final do estudo avaliará a eficácia e segurança da vacina em longo prazo seguindo os participantes por mais três anos (BISWAL *et al.*, 2019)

A vacina TV003 do NIH/ Instituto Butantan contém os quatro vírus da dengue atenuados (DEN1 Δ 30, DEN2/4 Δ 30, DEN3 Δ 30/31 e DEN4 Δ 30), em que as cepas atenuadas DENV-1 e DENV-4 foram desenvolvidas através da deleção de 30 nucleotídeos (Δ 30) localizados na região 3'UTR do genoma viral. A atenuação do DENV-3 foi por deleção de 30 e 31 nucleotídeos na região 3'UTR (KALLAS *et al.*, 2020). A cepa atenuada DENV-2 foi construída por quimerização utilizando DENV4 Δ 30 no qual foram inseridos genes das proteínas do envelope (E) e pré-membrana (prM) do DENV2 (PRECIOSO *et al.*, 2015).

No estudo de fase I, diferentes versões de vacinas monovalentes foram testadas em seres humanos, seguidas pela definição de uma vacina com formulação tetravalente com ótima eficiência. (GUY *et al.*, 2016). Verificou-se que após vacinação com TV003 foram detectados anticorpos dos quatro sorotipos de DENV em 91,7% dos indivíduos e que a potência protetora contra o DENV-2 foi superior à da vacinação com a CYD-TDV. Na TV005 foram adicionados mais componentes de vírus atenuados DENV2 do que ao TV003. Nesta fase, foi observado que a TV005 obteve imunogenicidade e reatogenicidade satisfatórias, após uma dose da vacina (GUY *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2020). Com isso, o desenvolvimento passou para fase II com as formulações TV003 e TV005 por induzirem anticorpos neutralizantes mais equilibrados (DENG *et al.*, 2020).

O estudo de fase III está sendo realizado em vários locais no Brasil, predominando áreas urbanas onde há transmissão de dengue. O número total de participantes é de 17.000 e todas as pessoas serão monitoradas por um período de cinco anos (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2016).

Para análise da eficácia serão considerados todos os casos de dengue que ocorrem em 28 dias após a vacinação. Para avaliação da segurança os participantes serão divididos em três faixas etárias: 2 a 6; 7 a 17 e 18 a 59 anos, onde dois terços dos voluntários receberão uma dose única da vacina candidata, enquanto um terço receberá uma injeção inativa de placebo (PRECIOSO *et al.*, 2015).

Uma das vantagens dessas duas vacinas em relação à Dengvaxia® é a redução do número de doses necessárias. Enquanto a Dengvaxia® são três doses com intervalo de 6 meses, a vacina Takeda está sendo considerada para duas doses

com intervalo de 3 meses e a vacina TV003 para uma dose única (WILDER- SMITH, 2020).

1.9.2 Resposta imunológica da vacina da dengue

Uma vacina para a dengue deve induzir tanto uma potente resposta humoral (com a geração de anticorpos neutralizantes) como celular contra os quatro sorotipos do DENV. Portanto, uma vacina tetravalente deve induzir uma resposta imunológica mediada tanto por células B quanto por células T contra os quatro sorotipos, reduzindo a elaboração e produção de respostas imunológicas ineficientes e com reatividade cruzada.

A administração da vacina CYD-TVD (Dengvaxia®) em indivíduos soronegativos foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra DENV-4, contudo, apenas níveis reduzidos de anticorpos contra os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Em indivíduos soropositivos, ocorreu a indução de anticorpos com reatividade cruzada, e a manutenção ou aumento na resposta humoral pré-existente (HENEIN *et al.*, 2017). A inabilidade em induzir respostas T CD8+ contra o DENV tem sido apontada como uma das explicações para a baixa eficiência na proteção de indivíduos soronegativos que receberam a vacina (GUY; JACKSON, 2016; SLIFKA; AMANNA, 2018). Contudo, a reativação de células T de memória contra DENV NS3, similar a uma infecção natural, foi observada em indivíduos imunizados, sugerindo que a permanência de uma resposta T efetora antígeno-específica é importante na proteção imunológica (DAYAN *et al.*, 2014; HARENBERG *et al.*, 2013). De fato, a Dengvaxia® mostrou-se capaz de desenvolver uma resposta T CD8+ direcionada à NS3 do YF17, e uma resposta T CD4+ tipo-específica contra o DENV, em indivíduos soronegativos, enquanto que a aplicação em indivíduos soropositivos foi capaz de reativar respostas T CD8+ pré-existentes contra o DENV NS3. A administração da vacina parece favorecer uma resposta voltada na produção de IFN γ , sugerindo uma resposta Th1 (HARENBERG *et al.*, 2013; GUY *et al.*, 2008).

A vacina Takeda mostrou-se capaz de induzir potentes anticorpos neutralizantes contra epítomos quaternários dos sorotipos DENV-1 e DENV-2. Contudo, não foram observados anticorpos epítomo específicos contra o sorotipo DENV-3 (SWANSTROM *et al.*, 2018). Além disso, a imunização com duas doses da vacina foi capaz de desencadear respostas efectoras T CD8+ e T CD4+ específicas e

de reatividade cruzada contra DENV-2, com permanência superior a seis meses (CHU *et al.*, 2015). Contudo, ainda não sabe se essas respostas T CD8+ de reatividade cruzada são protetoras ou patogênicas (GALULA *et al.*, 2019).

A vacina NIH/Butantan TV003 mostrou-se capaz de induzir uma potente resposta tipo-específica contra os quatro tipos do DENV, tendo gerado anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos (KALLAS *et al.*, 2020). Ainda, um estudo sugere que sequências monovalentes da vacina são capazes de induzir anticorpos anti-E com reatividade cruzada que contribuem significativamente para a atividade de neutralização heteróloga observada na vacina (TSAI *et al.*, 2015). Além disso, a vacinação com a vacina NIH/Butantan TV003 não somente promoveu uma geração de anticorpos protetores, como, também, foi capaz de induzir respostas T CD8+ específicas, focadas principalmente nas proteínas NS, que são altamente conservadas entre os sorotipos (KIRKPATRICK *et al.*, 2016). Mais, respostas T CD4+ de mesma magnitude, frequência e especificidade foram observadas entre indivíduos imunizados e aqueles que foram naturalmente expostos ao DENV, sugerindo uma resposta protetora contra a doença (ANGELO *et al.*, 2017).

1.10 Vigilância sanitária e controle da qualidade de vacinas

De acordo com a RDC n.º 73/2008 da ANVISA, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas para consumo no Brasil, é delegada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) a responsabilidade pela liberação de todos os lotes de vacinas utilizadas no país. Desta forma, o INCQS/Fiocruz desempenha um importante papel dentro e fora do Programa Nacional de Imunizações (PNI), tanto por analisar os lotes de vacinas adquiridas pelo programa, quanto pelo seu caráter consultivo ao Ministério da Saúde na identificação de prioridades, formulação de diretrizes nacionais nas áreas de pesquisa, produção, aquisição, distribuição e utilização de imunobiológicos, fundamentado em avaliações sistemáticas e em dados técnico-científicos atualizados (BRASIL, 2008).

O controle da qualidade de vacinas é uma ação da Vigilância Sanitária de extrema importância, onde as autoridades sanitárias nacionais devem monitorar a segurança, qualidade e eficácia de imunobiológicos (MIRANDA; HENRIQUES, 2005). Entende-se por Vigilância Sanitária o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir

ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990).

A expressão “Controle da qualidade” refere-se às ações relacionadas com a medição da qualidade, para avaliar se os requisitos estão a ser respeitados para a finalidade a que se destina. O controle da qualidade de vacinas é realizado pelo laboratório produtor e deve obedecer a critérios padronizados, estabelecidos pela OMS. Após aprovação em testes de controle do laboratório produtor, cada lote de vacina é submetido a análises documental e/ ou laboratorial no INCQS.

A análise documental consiste na análise do Protocolo Resumido da Produção e Controle da Qualidade (PRPCQ) das diversas etapas de produção, lote final e matérias primas. As análises laboratoriais são realizadas para avaliar a eficácia (ensaio de identidade, estabilidade e potência) e segurança (testes de esterilidade, toxicidade e pirogênio ou endotoxina bacteriana).

1.10.1 Ensaio de potência

A estimativa da potência das vacinas consiste na avaliação do seu potencial de indução de imunidade protetora pós-administração (METZ *et al.*, 2002). Testes de potência são realizados para demonstrar que a vacina será capaz de alcançar um “dado resultado”, ou seja, imunidade protetora. Diferentes métodos de teste, como ensaios de propriedades físico-químicas, antigenicidade, imunogenicidade, infecciosidade e proteção contra infecção ou doença, são usados para medir a potência. Sua aplicabilidade depende da natureza dos antígenos da vacina e do objetivo do teste (TAFFS, 2001).

Os ensaios de potência *in vivo* utilizados no controle da qualidade de imunobiológicos utilizam um grande número de animais, além da alta variabilidade e longa duração dos ensaios (MOREIRA *et al.*, 2020). Com isso, passou a ser tendência mundial a reavaliação do uso de animais nos experimentos de testes laboratoriais. A partir da criação de diversas instituições, com o objetivo de desenvolver e validar novos métodos com implementação regulatória de testes alternativos em diversos países, a fim de legalizar e harmonizar o uso dos animais surgiu um novo paradigma internacionalmente reconhecido chamado de 3Rs (SCHECHTMAN, 2002; MEYER, 2003).

O paradigma 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que significa a redução de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento e a busca de métodos alternativos que venham substituir os testes *in vivo* (DIPASQUALE; HAYES, 2001).

No desenvolvimento da vacina da dengue não há um modelo animal que reproduza completamente as diversas manifestações da dengue (OLIVEIRA *et al.*, 2016; PAES *et al.*, 2009). A falta de um modelo animal adequado torna difícil avaliar a eficácia das vacinas candidatas e identificar ou estabelecer possíveis correlatos de proteção *in vivo*. Os resultados de estudos não clínicos usando macacos e cepas de camundongos suscetíveis, como da linhagem AG129, sugerem, no entanto, que a proteção contra a dengue só pode ser relacionada com a presença ou ausência de anticorpos neutralizantes de vírus (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013; DENG *et al.*, 2020).

A eficácia das vacinas atenuadas está relacionada ao número de partículas vivas, que pode ser determinado por contagem ou titulação, sendo um método essencialmente *in vitro* (METZ *et al.*, 2002). Para as vacinas tetravalente da dengue, a potência deve ser avaliada em termos de títulos individuais de cada um dos quatro sorotipos do vírus contidos em uma dose da vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

Existem diversas metodologias capazes de avaliar a potência das vacinas virais tais como reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) (RANHEIM *et al.*, 2006), citometria de fluxo (LAMBETH *et al.*, 2005), ensaios imunoenzimático (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013), titulação viral, teste de neutralização por redução de placas (PRNT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007), unidades formadoras de placas (UFP) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007), imunofluorescência, entre outros.

Os ensaios de potência e termoestabilidade da vacina tetravalente da dengue são ensaios biológicos, que segundo recomendações técnicas da OMS, fundamentam-se na avaliação da infectividade em cultura de células apropriadas, de cada um dos quatro sorotipos de vírus presentes na vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). O ensaio da Dengvaxia® realizado pelo produtor consiste na avaliação da presença ou ausência de infecção viral em culturas celulares,

determinada através de alterações imunocolorimétricas ocasionadas pela presença do vírus específico para cada sorotipo, sendo o título viral expresso em \log_{10} CCID₅₀ (50% *cell culture infectious dose*) por dose. Em cada ensaio realizado deve-se incluir um lote da vacina de referência de trabalho, cuja potência tenha sido previamente estabelecida, a fim de controlar a precisão e a reprodutibilidade do sistema de ensaios (SANTOS *et al.*, 2011).

A metodologia para ensaios biológicos da vacina tetravalente da dengue ainda não está estabelecida em monografias farmacopéicas. Um ensaio alternativo para avaliar a potência da vacina dengue seria a citometria de fluxo por ser mais rápida e específica.

1.10.2 Uso de citometria de fluxo na avaliação de imunobiológicos.

Nos últimos anos, a citometria de fluxo tem sido utilizada em diversas questões técnico-científicas, entre estas para estudar a interação célula-vírus e podendo também detectar rapidamente células infectadas por vírus (KAO *et al.*, 2001).

O método é amplamente utilizado para analisar a expressão da superfície celular e de moléculas intracelulares, caracterizando e definindo diferentes tipos de células em uma população celular heterogênea, avaliando a pureza de subpopulações isoladas e analisando o tamanho e a granulidade de células. A princípio um citômetro de fluxo mensura a intensidade de fluorescência produzida, por exemplo, pela excitação de substâncias através de uma fonte de luz (em geral um ou mais LASERs) e a consequente emissão de fluorescência, esta por sua vez detectada por um multiplicador de fótons (*photomultiplier*), e transformada em sinal eletrônico. Estes últimos são lidos em um software acoplado ao equipamento. Desta forma, é possível medir a intensidade da fluorescência produzida por anticorpos conjugados a fluorocromos que detectam proteínas ou ligantes que se ligam a moléculas específicas associadas a células, como a ligação de iodeto de propídio ao DNA (FLYNN; GORRY, 2019).

A avaliação da potência por citometria de fluxo pode ser realizada através da determinação do título da infecção viral, utilizando anticorpos conjugados à fluorocromo para marcar a célula. Esse ensaio é uma forma mais rápida para estimativa da potência em comparação com os ensaios convencionais, onde o resultado pode ser observado em menor tempo (LAMBETH *et al.*, 2005).

1.10.3 Uso de culturas de células em ensaios biológicos

A técnica de cultura celular é caracterizada pela manutenção de células vivas em laboratório, organizadas e acondicionadas em recipientes estéreis, permitindo assim a realização de técnicas com boa reprodutibilidade. A cultura de células em laboratórios possibilita a realização de ensaios de potência e citotoxicidade de vacinas de forma padronizada, de baixo custo e ainda dentro do princípio dos 3Rs (MIGITA, 2012).

A cultura celular traz diversas vantagens para o desenvolvimento de trabalhos científicos, mas assim como qualquer outra técnica meticulosa e específica, a mesma requer cautela, organização, e sensibilidade ao ser aplicada, uma vez que contaminações cruzadas são comumente apresentáveis. Outro ponto marcante são os meios ricos em nutrientes utilizados para o crescimento celular, que também propiciam o crescimento de diversos organismos. Desta forma, é necessária uma condição estéril para que o crescimento aconteça de forma adequada e controlada, além de metodologias de controle de qualidade feitas de forma rotineira (KASVI, 2017).

Existem diversas aplicações para as quais a cultura celular pode ser empregada, particularmente em estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, comumente utilizados para obtenção viral e fins diagnóstico de doenças, como também para análise de alvos farmacológicos, e produção de produtos biológicos, voltados para produção de imunobiológicos, vacinas e anticorpos monoclonais (FRESHNEY, 2006; MIGITA, 2012;).

O emprego de culturas celulares em ensaios biológicos requer conhecimento prévio das linhagens criopreservadas. Cada célula possui características próprias que devem ser consideradas quando utilizadas em um determinado ensaio (KASVI, 2017).

O banco de células do INCQS tem seu arcabouço baseado na aquisição de linhagens celulares oriundas de diferentes bancos celulares centrais, tais como a ATCC (*American Type Culture Collection*), Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas (*European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC*, em inglês) e BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro). As ampolas de linhagens celulares certificadas e autenticadas são denominadas como células sementes, que são criopreservadas de acordo com as especificações estabelecidas pelo POP (Procedimento Operacional Padrão) do Setor de Cultura de Células do Instituto.

Realiza-se um monitoramento periódico das culturas em uso e as condições de cultivo também são controladas.

1.10.3.1 *Linhagem celular VERO*

Linhagens celulares contínuas, ou imortalizadas, originárias de tecidos de mamíferos tornaram-se importantes ferramentas das ciências da saúde e da indústria farmacêutica, com uso diversificado na produção de produtos biológicos diversos (OSADA *et al.*, 2014). Uma das mais frequentes utilizadas é a linhagem celular VERO, estabelecida em 1962, na Universidade de Chiba no Japão, a partir da cultura primária de tecido de rins de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*) (YASUMURA; KAWAKITA, 1963).

O uso dessa linhagem está fortemente ligado à susceptibilidade dessas células à uma grande variedade de vírus de importância para a saúde, como sarampo (SASAKI; MAKINO; KASAHARA, 1964), rubéola (RHIM; SCHELL, 1967; LIEBHABER; RIORDAN; HORSTMANN, 1967), arboviroses (SIMIZU; RHIM; WIEBENGA, 1967; RHIM *et al.*, 1969), caxumba e adenovírus (RHIM *et al.*, 1969), em decorrência de uma deleção dos genes de transcrição de interferon do tipo 1 em resposta às infecções virais (DESMYTER; MELNICK; RAWLS, 1968; OSADA *et al.*, 2014).

Dessa forma, após seu estabelecimento e distribuição global, para os mais diversos bancos de células do mundo, as aplicações da linhagem VERO tornaram-se extensas, sendo utilizadas desde laboratórios de virologia e pesquisa, até o diagnóstico hospitalar e a produção e testagem de vacinas contra os mais diversos agentes etiológicos (OSADA *et al.*, 2014; O'RYAN, 2007; MONATH *et al.*, 2004; BARRETT *et al.*, 2009; MONTOMOLI *et al.*, 2012).

No contexto da dengue, células VERO tem sido largamente utilizada na pesquisa, desenvolvimento, produção e testagem de vacinas contra o DENV (BARRETT *et al.*, 2009; LECOUTURIER *et al.*; 2019; DAYAN *et al.*, 2014; WHITE *et al.*, 2021). A vacina tetravalente contra a dengue baseada em vírus atenuados quiméricos, Dengvaxia® (CYD-TDV), tem sua produção e ensaios de controle de qualidade em células VERO (LECOUTURIER *et al.*, 2019).

1.10.3.2 Linhagem celular HEK293T

As células HEK293 são uma linhagem celular aderente de característica epitelioide desenvolvidas a partir de cultura primária de células provenientes de um rim embrionário humano transformadas pela exposição a fragmentos de DNA do adenovírus (Ad) 5 (GRAHAM *et al.*, 1977). Como tal, essa linhagem apresenta fenótipo característico de células transformadas por adenovírus, como multiplicação celular livre de inibição por contato, ou seja, sem apresentar estímulo de parada por contato célula-célula, e crescimento celular distribuído em ilhas ou aglomerados celulares (GRAHAM *et al.*, 1977). Além disso, essas células carregam a porção terminal esquerda do genoma do Ad5, que inclui os genes E1A e E1B do vírus (LOUIS; EVELEGH; GRAHAM, 1997), em decorrência disso, essas células são largamente utilizadas na produção de partículas virais e proteínas recombinantes (MALM *et al.*, 2020).

Diversas variantes das células HEK293 foram desenvolvidas ao longo do tempo com o objetivo de aumentar a eficiência e a produção de proteínas recombinantes e partículas virais para os mais diversos fins (MALM *et al.*, 2020). Dentre essas variantes está a linhagem HEK293T, caracterizada pela expressão constitutiva de um alelo sensível à temperatura do antígeno T do vírus símio 40 (SV40), um adenovírus encontrado em humanos e macacos, definido como um promotor viral forte (DuBRIDGE *et al.*, 1987).

Pelas características da linhagem HEK293T e sua susceptibilidade para transfeções, manipulação gênica e infecção viral, a linhagem tem sido amplamente utilizada na pesquisa de diversas famílias virais. De fato, foi demonstrado que células HEK293T apresentam susceptibilidade a infecções pelo DENV, para os mais diversos sorotipos, assim como para outros membros da família *Flaviviridae* (JITOBOAM *et al.*, 2016; RATTANACHUEN *et al.*, 2011; RUNGRUENGPHOL *et al.*, 2015; McLINDEN *et al.*, 2017). Contudo, não há estudos demonstrando a sensibilidade dessa linhagem para infecções utilizando vacinas tetravalentes contra a dengue compostas por vírus atenuados.

Visto que a Dengvaxia® caracteriza-se por vírus atenuados quiméricos cujo arcabouço viral é proveniente da cepa viral da febre amarela YF17D, é possível que a susceptibilidade dessa linhagem à infecção pela cepa YF17D seja importante para estudos de infectividade envolvendo a vacina. Nesse contexto, estudos tem

demonstrado que células HEK293T apresentam sensibilidade ao vírus YF17D (McLINDEN *et al.*, 2017; YAKASS; FRANCO; QUAYE, 2020) e, ainda, que a cepa atenuada (YF17D) mostrou-se mais infecciosa nessa linhagem que a cepa selvagem originária (Asibi) (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2016).

1.10.3.3 *Linhagem celular THP-1*

A célula THP-1 é uma linhagem celular monocítica humana derivada de um paciente do sexo masculino com 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda. Essas células se assemelham e podem se diferenciar em macrófagos, que são o alvo principal do DENV (PASCAPURNAMA *et al.*, 2017).

As células THP-1 no estado de monócito podem ser diferenciadas em um fenótipo semelhante a macrófago usando o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), 1,25-dihidroxitamina D3 (vD3) ou fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014). O PMA atua através da ativação da proteína quinase induzindo a diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos. Essas células após a diferenciação passam a ter uma diminuição da replicação de DNA, apresentam aderência ao substrato, expressão de um novo conjunto de marcadores de superfície, como CD11b, apresentar aumento na atividade fagocítica e adquirir morfologia semelhante a macrófagos primários (SCHWENDE *et al.*; 1996; GUO *et al.*, 2012).

Alguns estudos mencionaram que as vantagens na utilização da linhagem celular THP-1 como modelo na diferenciação em macrófagos, *in vitro*, são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular permitindo o seu estudo em diferentes estágios (repouso *versus* ativado) (THEUS; CAVE; EISENASH, 2004; CHANPUT; MES; WICHERS, 2014). Foi sugerido também que os estudos de mecanismos de infecção do DENV e fenômeno de ADE poderiam ser realizados utilizando essas células diferenciadas em macrófagos. (JIANG; SUN, 2020).

1.10.3.4 *Linhagem celular U937*

A célula U937 é uma linhagem celular de leucemia mielóide humana pró-monocítica e foi isolada do linfoma histiocítico de um homem de 37 anos de idade. A

diferença básica entre as células U937 e THP-1 é a origem e o estágio de maturação (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

A linhagem celular U937 tem sido amplamente utilizada como modelo para investigar uma variedade de processos biológicos relacionados à função de monócitos e macrófagos (BAEK *et al.*, 2009). Embora haja estudos sobre vírus da dengue utilizando as células U937 (DIAMOND *et al.*, 2000), não há relatos da utilização dessa linhagem celular com a vacina tetravalente da dengue até a finalização da tese.

2 JUSTIFICATIVA

Um desafio para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra dengue é que a vacina deve gerar, simultaneamente, uma resposta imune protetora contra todos os quatro sorotipos do DENV. A resposta imune desbalanceada resulta em níveis de sub-proteção de anticorpos contra um dos sorotipos, podendo assim ocorrer ADE (THOMAS, 2014).

Uma vacina que induz níveis sub-protetores de anticorpos anti-DENV pode não ser somente ineficiente, mas também causar potencialmente a dengue grave mediada por ADE, após a infecção. Além disso, apesar da indução inicial de uma resposta protetora de anticorpos, os níveis de anticorpos poderiam diminuir e atingir concentrações baixas que levariam ao fenômeno ADE algum tempo após a vacinação (ZELLWEGER *et al.*, 2013).

Os testes de controle de qualidade preconizados, para garantir a eficácia da vacina tetravalente da dengue são identidade, potência e termoestabilidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Para determinação da potência a OMS recomenda ensaios de titulação viral por plaque, CCID₅₀ ou imunofocus em cultura de células VERO ou outras células sensíveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Embora as células VERO sejam amplamente utilizadas por serem de fácil manutenção, manipulação e serem suscetíveis à infecção para a maioria dos vírus vacinais, há sérios questionamentos sobre a sua utilização em se tratando de estudos com DENV. Foi descrito que células que não possuem receptores Fc (FcR) como células VERO, podem ser utilizadas para demonstrar a imunidade monotípica, com proteção contra DENV homotípico, mas são incapazes de prever proteção contra infecções secundárias heterotípicas por dengue. Entretanto, as células que possuem receptores Fc, como células THP-1, demonstraram importante correlação entre título de neutralização e proteção (JIN *et al.*, 2009).

Além disso, a avaliação da potência através do método de determinação do título viral por CCID₅₀ realizado em células VERO geralmente necessita de um longo tempo, em torno de sete dias, para obtenção do título. Para isso, existem outras metodologias que podem ser avaliadas além das citadas anteriormente, como a citometria de fluxo.

Neste contexto, o desenvolvimento de um ensaio para avaliação da resposta do anticorpo anti-DENV em células com receptor Fc e metodologias mais rápidas se justificam dada a necessidade de rápida resposta à demanda de uma vacina contra o que representa atualmente uma das mais importantes arboviroses no mundo.

Com isso, a proposta do estudo é avaliar e comparar títulos de infectividade obtidos com as diferentes linhagens celulares humanas e a VERO para o desenvolvimento de uma metodologia alternativa à clássica, que demonstre maior exatidão, sensibilidade, rapidez e que seja mais fisiologicamente próxima à realidade humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a infectividade da vacina tetravalente da dengue em diferentes linhagens celulares humanas e desenvolver uma metodologia para avaliação da potência.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a infectividade do vírus vacinal da vacina tetravalente da dengue em células das linhagens celulares HEK293T, THP-1 e U937;
- Determinar o título de infectividade utilizando reação imunocolorimétrica (ensaio do produtor) em células VERO, THP-1, U937 e HEK 293T;
- Comparar os resultados obtidos nas quatro linhagens com a metodologia imunocolorimétrica (produtor);
- Avaliar o grau de infecção pela vacina utilizando ferramenta alternativa como citometria de fluxo e imunofluorescência nas diferentes linhagens celulares VERO, THP-1, U937 e HEK 293T;
- Analisar comparativamente as potências da vacina tetravalente da dengue estimadas por citometria de fluxo e imunocolorimetria, em ensaio com células VERO.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de vacinas

Amostras de vacina tetravalente da dengue, Dengvaxia®, produzidas pelo produtor Sanofi Pasteur foram armazenadas e mantidas de 2 a 8°C. Para a realização dos ensaios desse estudo foi selecionado um lote comercial da vacina.

A vacina liofilizada em frasco multidoses foi reconstituída com solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl), conforme recomendação do fabricante.

4.2 Cultura de Células

Para os ensaios realizados, foram utilizadas quatro linhagens celulares comerciais: VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano), THP-1 (células de leucemia monocítica), U937 (células de linfoma histocítico humano) e HEK293T (células de rim embrionário humano).

4.2.1 Manutenção das linhagens celulares

VERO:

A linhagem celular VERO foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC® CCL-81™) e mantida no acervo do Setor de Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS. A partir das células obtidas, foram produzidos lotes de células-mestre (LM), que são usados para a produção de lotes de células de trabalho (LT). Os LT constituem o estoque de células utilizado na rotina de ensaios realizados no INCQS. As culturas celulares de VERO utilizadas nesse estudo, resultantes do descongelamento e manutenção das ampolas dos LT, encontravam-se entre as passagens 142 e 150, sendo esta uma obrigatoriedade para o controle de qualidade dos ensaios.

As células VERO foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM), (Gibco® Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos) com 5% Soro Fetal Bovino (SFB) (Hyclone® Thermo Scientific Inc., Estados Unidos), suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco), 26 mM NaHCO₃ (Eurobio Scientific®, Paris, França), 100 U/mL de

penicilina e 100 µg/mL de dihidrostreptomicina (Eurobio), em estufa umidificada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$.

Para a realização do subcultivo (passagem), foi retirado o meio de cultura e lavada a monocamada duas vezes com solução de tampão fosfato salino (PBS) [1x] sem Ca^{+2} e sem Mg^{+2} (Eurobio). Após a lavagem foi adicionada solução de Tripsina Versane EDTA (Lonza®, Suíça) até que a monocamada se desprendesse.

Após o desprendimento da monocamada, foi adicionado meio MEM 5% SFB, previamente preparado, para a inibição da ação da tripsina.

As células foram dissociadas mecanicamente por aspiração e, então, contadas, em câmara de Neubauer, para o cálculo do volume necessário para subcultivo.

THP-1:

A linhagem celular THP-1 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ código 0234) e mantida no acervo do Setor de Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS. A partir das células obtidas, foram produzidos lotes de células-mestre (LM), que são usados para a produção de lotes de células de trabalho (LT). Os LT constituem o estoque de células utilizadas nos ensaios. As culturas celulares de THP-1 utilizadas nos ensaios, resultantes do descongelamento e manutenção dos LT, encontravam-se, no máximo, até a passagem 10, sendo esta uma obrigatoriedade para o controle de qualidade dos ensaios.

As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma – Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) com 10% de SFB (HyClone), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 26 mM de NaHCO_3 (Eurobio), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de dihidrostreptomicina (Eurobio) e 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), em estufa umidificada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$.

Ao atingir densidade celular entre 8×10^5 células/mL e 1×10^6 células/mL ou ao completar 5-6 dias de cultivo contínuo, foi realizada a passagem da cultura de células. Para isso, a suspensão celular foi homogeneizada mecanicamente, por aspiração, e, posteriormente, foi realizada a determinação da densidade celular viável através de contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, mantendo-se, parte ou integralmente, o meio condicionado, meio de cultura contendo produtos do metabolismo celular, gerado pelas células em cultura, adicionou-se o volume de meio

fresco (RPMI 1640 10% SFB - suplementado) necessário para a suspensão celular atingir densidade de, aproximadamente, 2×10^5 células/mL.

U937:

A linhagem celular U937 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ código 0242) e mantida no acervo do Setor de Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS. A partir das células obtidas, foram produzidos lotes de células-mestre (LM), que são usados para a produção de lotes de células de trabalho (LT). Os LT constituem o estoque de células utilizadas nos ensaios. As culturas celulares de U937 utilizadas nos ensaios, resultantes do descongelamento e manutenção dos LT, encontravam-se, no máximo, até a passagem 10, sendo esta uma obrigatoriedade para o controle de qualidade dos ensaios.

As células U937 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma- Aldrich) com 10% de SFB (HyClone), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 26 mM de NaHCO_3 (Eurobio), 10 mM de HEPES, 2,5 g/L de glicose (Sigma Aldrich), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de dihidrostreptomicina (Eurobio) e 1mM de piruvato de sódio (Gibco), em estufa umidificada a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$.

Ao atingir densidade celular entre 1×10^6 células/mL e 2×10^6 células/mL ou ao completar 4-5 dias de cultivo contínuo, foi realizado o subcultivo da cultura de células. Para isso, a suspensão foi homogeneizada mecanicamente, por aspiração, e, posteriormente, foi realizada a determinação da densidade celular viável, através de contagem em câmara de Neubauer. O restante da suspensão foi centrifugado por 5 minutos a 200 g (Centra MP4R, IEC), para precipitação do conteúdo celular, com posterior descarte do sobrenadante (meio saturado/antigo) e ressuspensão em volume de meio fresco (RPMI 1640 10% SFB - suplementado) necessário para atingir densidade de, aproximadamente, 1×10^5 células/mL.

HEK293T:

A linhagem celular HEK293T foi cedida, gentilmente, pelo Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, da Dra. Raquel Ciualschi Maia, do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e mantida no acervo do Setor de Cultura de Células do INCQS. A partir das células obtidas, foram produzidos lotes de células-mestre (LM), que são usados para a produção de lotes de células de trabalho (LT). Os LT constituem o estoque de células utilizado na rotina de ensaios realizados no INCQS.

As culturas celulares de HEK293T utilizadas nos ensaios, resultantes do descongelamento e manutenção das ampolas dos LT, encontravam-se, no máximo, até a passagem 10, sendo esta uma obrigatoriedade para o controle de qualidade dos ensaios.

As células HEK293T foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich) com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (HyClone), suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco), 26 mM NaHCO₃ (Eurobio), 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de dihidrostreptomicina (Eurobio), em estufa umidificada a 37°C ± 1°C, 5% ± 1% CO₂.

Para a realização do subcultivo, realizado após período de 3-4 dias de cultivo, foi retirado o meio de cultura e lavada, cuidadosamente, a monocamada celular uma vez com solução de PBS [1x] sem Ca⁺² e sem Mg⁺² (Eurobio). Após a lavagem, foi adicionada solução de Tripsina Versane EDTA (Lonza) até que a monocamada se desprendesse.

Após o desprendimento da monocamada, foi adicionado DMEM 10% SFB, previamente preparado, para a inibição da ação da tripsina, com posterior centrifugação por 5 minutos a 200 g (Centra MP4R, IEC) para precipitação do conteúdo celular.

O sobrenadante foi descartado e o conteúdo celular foi ressuscitado em meio fresco (DMEM 10% SFB – suplementado), sendo as células dissociadas mecanicamente por aspiração. Então, foi realizado um *split* celular de 1:10, com a adição em nova garrafa de cultura de 1 (uma) parte da suspensão celular para 9 (nove) partes de meio de cultura fresco (DMEM 10% SFB – suplementado) para a área de superfície de cultivo da garrafa.

4.2.2 Preparo e fornecimento das suspensões celulares

As suspensões celulares foram preparadas e fornecidas sempre no dia da realização dos ensaios. As células fornecidas, para todas as linhagens celulares utilizadas, encontravam-se, sempre, durante a fase exponencial da curva de crescimento celular. Para isso, todas as células foram subcultivadas previamente, em período específico para cada linhagem celular, de modo que no dia do fornecimento as culturas estivessem em fase exponencial e em quantidade suficiente para o

fornecimento. A manutenção das células em fase exponencial é obrigatória para o controle da qualidade dos ensaios realizados.

Para as células VERO, o fornecimento foi realizado em meio MEM (1x), contendo solução de bicarbonato de sódio 5,6% (p/v), 10% SFB, 200 mM L-glutamina e 0,2% de Penicilina-Dihidroestreptomicina, e concentração celular de 3×10^5 células/mL $\pm 10\%$ em volume necessário para a realização do ensaio.

Para as células THP-1 e U937, o fornecimento foi realizado em meio RPMI 1640, contendo 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 26 mM de NaHCO₃, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de dihidroestreptomicina e 1 mM de piruvato de sódio (para as células THP-1) e 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 26 mM de NaHCO₃, 10 mM de HEPES, 4,5 g/L de glicose, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de dihidroestreptomicina e 1mM de piruvato de sódio (para as células U937), com concentração celular de 1×10^6 células/mL $\pm 10\%$ em volume necessário para a realização do ensaio (PARK et al., 2007).

Por fim, para as células HEK293T, o fornecimento foi realizado em meio DMEM (1x), contendo 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 26 mM NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de dihidroestreptomicina, com concentração celular de 3×10^5 células/mL $\pm 10\%$ em volume necessário para a realização do ensaio.

4.3 Padronização do protocolo de diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos

Inicialmente foram avaliadas diferentes concentrações de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) a fim de definir a melhor concentração de PMA na diferenciação dos monócitos.

Foram utilizadas placas de 96 poços (Falcon® Corning, 353075, Nova York, Estados Unidos) contendo 100 µL de células THP-1 e U937 em meio RPMI 1640 10% SFB na concentração de 1×10^6 células/mL por poço (PARK et al., 2007). As células foram induzidas para diferenciação em macrófagos com diferentes concentrações de PMA – 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL – por 48h em estufa a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C para posterior dosagem de óxido nítrico (NO). Em seguida, foi adicionado meio RPMI fresco e as placas foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO₂ por 24h para as células descansarem.

Para confirmar a mudança fenotípica, as células foram avaliadas quanto: (i) às suas características morfológicas por microscopia de contraste de fase utilizando microscópio óptico invertido (Olympus), com posterior mensuração da área citoplasmática através do software ImageJ® (versão 1.53); (ii) à atividade de óxido nítrico sintetase, através da dosagem de NO pelo método de Griess e (iii) quanto à expressão de marcadores de membrana através do ensaio de citometria de fluxo utilizando marcador CD11b e verificação da viabilidade celular.

4.3.1 Dosagem de nitrito pelo método de Griess

A detecção de nitrito foi realizada em colaboração com o Dr. Fausto Ferraris do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS. O ensaio foi realizado para verificar a produção de óxido nítrico (NO), que está relacionada ao metabolismo de células diferenciadas em macrófagos.

Baseado no método descrito por Guevara e colaboradores (1998), para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO^-), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se a uma placa de ELISA de 96 poços 50 μL do sobrenadante da cultura em triplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtylethylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 a 2,5% (solução B). Para a confecção da curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μM passou por diluições seriadas (fator 2) em RPMI suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 450nm. As absorbâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva-padrão.

4.3.2 Determinação da diferenciação de células THP-1 e U937 pela expressão de CD11b em citometria de fluxo

A fim de verificar se as células THP-1 e U937 diferenciaram em macrófagos, essas foram avaliadas quanto a expressão da molécula de superfície CD11b. Para este fim células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD11b conjugado

com o fluorocromo Alociocianina (APC) (BD Biosciences, Nova Jersey, Estados Unidos) e posteriormente analisadas em um citômetro de fluxo.

Para isso, numa microplaca de 96 poços foram distribuídos 100 µL de células THP-1 e U937 na concentração de 1×10^6 células/mL em triplicata. Estas foram diferenciadas, utilizando PMA nas concentrações de 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL, e seu sobrenadante descartado. Em paralelo, na mesma placa, células não diferenciadas em triplicatas foram utilizadas como controle. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS/BSA 1% (Albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich) e adicionados 100 µL de tripsina/EDTA (GIBCO) em cada poço. Após 4 minutos em estufa a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, a tripsina foi neutralizada utilizando o mesmo volume de meio RPMI 1640 10% SFB.

A suspensão celular foi transferida para os respectivos tubos do tipo *ependorf*, em que as células foram lavadas com 1mL de PBS/BSA 1% e centrifugadas a 367 *g* por 10 minutos (Eppendorf 5702, EUA). O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 100 µL do anticorpo monoclonal anti-CD11b por 30 minutos a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, na diluição de 1:200, protegida da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 200 µL de PBS/BSA 1% e centrifugadas novamente a 367 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 300 µL de PBS. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de citometria, lidas em aparelho de Citometria de fluxo (CytoFlex, Beckman Coulter) e analisadas em software CytExpert. No momento da leitura foram adicionados 3 µL de Iodeto de Propídeo (PI) aos tubos para avaliação de viabilidade celular. O equipamento utilizado pertence à plataforma de citometria do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e é controlado diariamente, através da calibração do aparelho utilizando beads de calibração comerciais.

4.4 Determinação do título da infecção e identificação da vacina dengue na célula VERO por imunocolorimetria

O protocolo do método de imunocolorimetria utilizado para análise do título viral foi gentilmente cedido pelo produtor da vacina (Sanofi Pasteur). Basicamente foi preparada uma microplaca, identificada com a data do ensaio, nome do operador, tipo da amostra e sorotipo a ser titulado. Para cada sorotipo foi designada uma cor

diferente - sorotipo 1 - preto; sorotipo 2 - azul; sorotipo 3 - vermelho e sorotipo 4 - verde.

Foram distribuídos 100 μ L da suspensão celular previamente preparada na concentração de 3×10^5 células/mL \pm 10% em meio MEM 10% de SFB nas microplacas de 96 poços da coluna 1 a 12, deixando a coluna 11 da placa vazia. Posterior a essa ação, distribuiu-se 100 μ L de meio de cultura MEM 10% SFB suplementado com 2% HEPES (GIBCO) previamente preparado nos poços da última coluna, destinados ao controle negativo das células.

As placas foram incubadas na estufa a uma temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 , até o momento da distribuição das diluições virais.

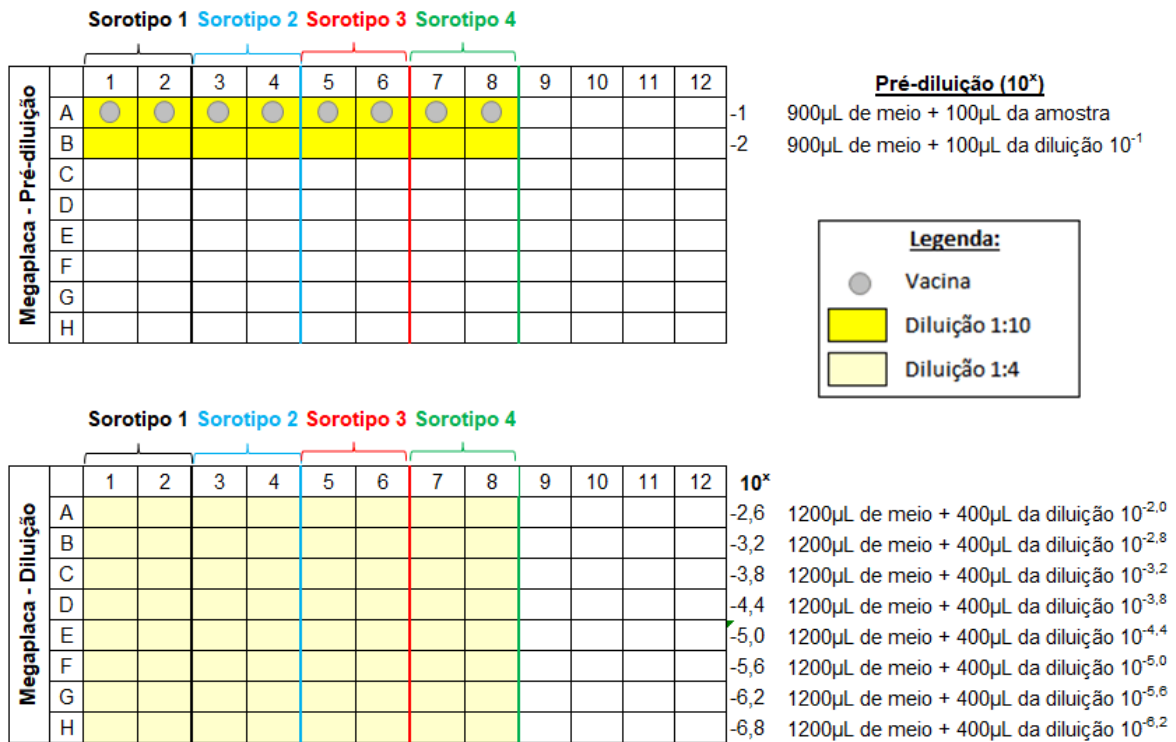
4.4.1 Preparação da diluição seriada em megaplaca

Para a preparação da diluição seriada, foi utilizado meio MEM 10% SFB com 2% de HEPES, o mesmo utilizado anteriormente para a distribuição do controle celular na microplaca e duas megaplacas com volume máximo de 2 mL/poço (Costar, EUA).

Foram realizadas duas pré-diluições, conforme apresentado na Figura 15: A primeira, de 10^{-1} , na qual foram adicionados 100 μ L da vacina reconstituída previamente em 900 μ L de meio de diluição, seguida de homogeneização cinco vezes com 800 μ L; e a segunda, de 10^{-2} , em que foram adicionados 100 μ L da diluição de 10^{-1} em 900 μ L de meio de diluição, com posterior homogeneização novamente.

Consecutivo a isso, foi realizada uma diluição serial de 1:4, adicionando-se 400 μ L da diluição anterior em 1200 μ L de meio de diluição, seguida de homogeneização com 400 μ L da solução dez vezes. O processo se repetiu até chegar à concentração de $10^{-6,8}$.

Figura 15 - Diluição seriada em megaplaca



Legenda: Preparação das diluições da vacina tetravalente da dengue para realização do ensaio imunocolorimétrico com células VERO. Em uma primeira megaplaca, prepara-se duas pré-diluições (10⁻¹ e 10⁻²) de forma seriada, para cada um dos quatro sorotipos virais. Em seguida, em uma segunda megaplaca, é realizada a diluição seriada de trabalho (10^{-2,6} a 10^{-6,8}), com fator de 1:4, a partir da pré-diluição de 10⁻², para cada um dos quatro sorotipos virais.

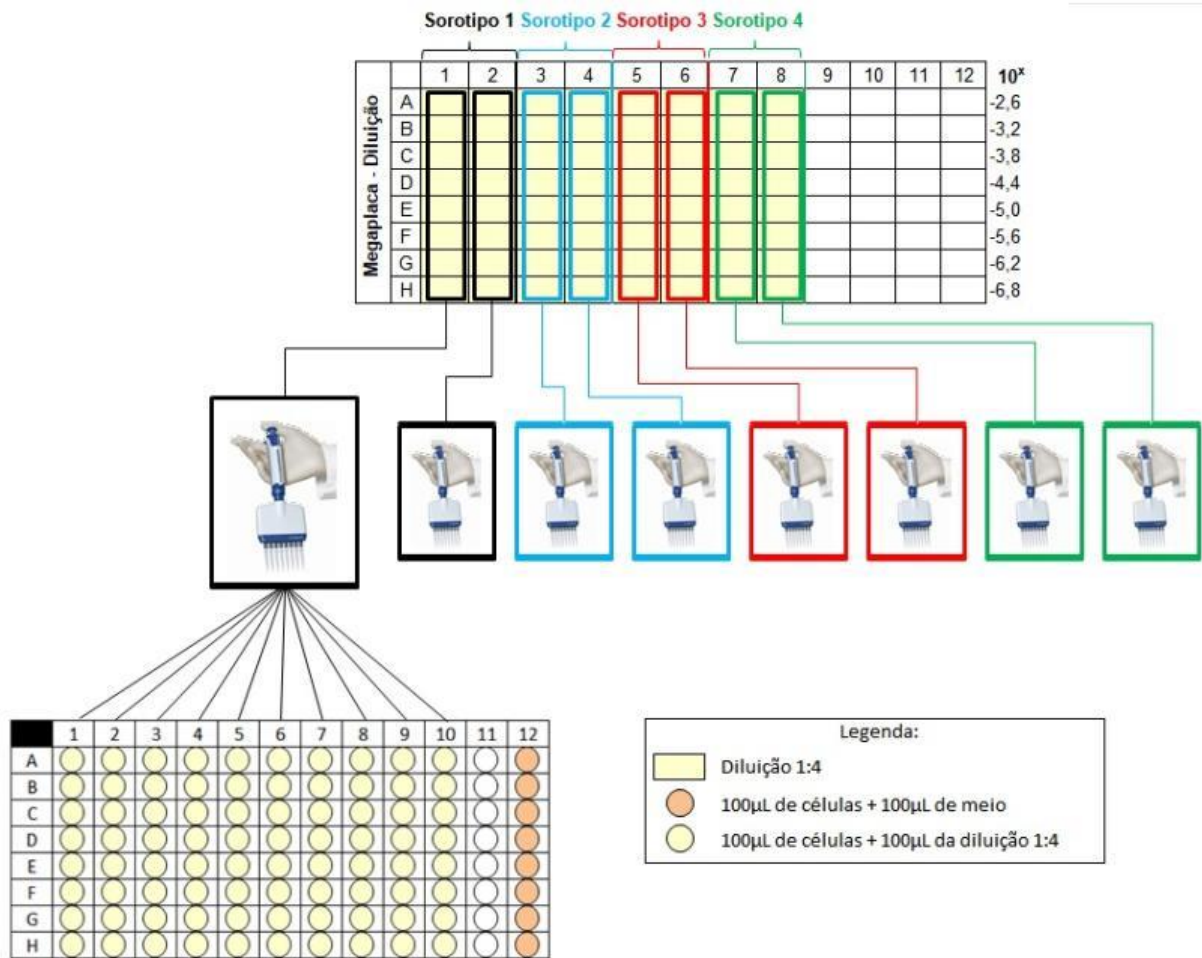
Fonte: (A autora, 2021).

4.4.2 Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas

Com o auxílio de uma micropipeta multicanal automática de volume variável (50 – 1200 µL), foram recolhidos 1000 µL da diluição da megaplaca da coluna 1 (sorotipo 1) e distribuídos 100 µL nas colunas 1 a 10 da microplaca de 96 poços, conforme Figura 16. Cada coluna da megaplaca preencheu uma microplaca correspondente ao sorotipo específico, com exceção da coluna 11 e do controle de células da microplaca que não receberam a diluição.

Em outra microplaca foi distribuído o volume dos poços da coluna 2 da Megaplaca (Sorotipo 1), e assim sucessivamente. A cada diluição as ponteiros foram trocadas e descartadas. As microplacas foram cobertas com filme adesivo e incubadas na estufa a 36 ± 1°C, 5% ± 1% CO₂ por sete dias.

Figura 16 - Diluições virais na microplaca contendo as células



Legenda: Distribuição das diluições de trabalho em microplacas de 96 poços, contendo as células de trabalho, identificadas previamente para cada um dos quatro sorotipos virais. Cada microplaca foi preparada com dez réplicas experimentais e uma réplica controle.

Fonte: (A autora, 2021).

4.4.3 Coloração das células para determinação de infecção viral

Após a incubação, as microplacas foram examinadas ao microscópio e o meio da placa foi retirado. As células foram fixadas com aproximadamente 250 μL a 300 μL de acetona 85% a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ e incubadas a temperaturas $\leq -20^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Em seguida, toda a acetona foi removida e retirado o excesso da solução através de leves batidas em papel absorvente. As placas foram colocadas para secar em fluxo laminar por 30 minutos ou até que todos os poços estivessem devidamente secos para evitar o desprendimento das monocamadas de célula.

Após a secagem total dos poços, foram distribuídos 100 μL do tampão de saturação (PBS com 2,5% de *skim milk*/ 0,5% de Triton X -100/ 0,05% de Tween 20) em cada poço da placa e incubadas por 30 minutos $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo, o

tampão foi removido e adicionados 50 µL de anticorpo primário monoclonal específico para cada sorotipo do vírus da dengue diluído em solução de tampão de saturação na proporção 1:5000, com posterior incubação por 45 minutos a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As soluções de anticorpo primário foram removidas dos poços por inversão, e as placas foram lavadas duas vezes em um recipiente contendo tampão de lavagem (PBS/ 0,05% de Tween 20/ água destilada). Após a lavagem, foi retirado o restante de solução dos poços, impelindo a placa contra papel absorvente. Após esse processo, foram distribuídos 50 µL da solução de anticorpo secundário de cabra anti-camundongo ligado à fosfatase alcalina – diluído de 1:1000 em tampão de saturação – em cada poço, seguido por incubação durante 45 minutos a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, o anticorpo secundário foi removido dos poços por inversão e as placas foram lavadas duas vezes em recipiente contendo tampão de lavagem. O excesso de solução que restou nos poços foi retirado em papel absorvente. Foram distribuídos 50 µL do substrato da fosfatase alcalina (NBT/BCIP) e as placas foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente, por 60 a 90 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente.

Após o período de secagem, as culturas de células inoculadas foram observadas a olho nu e/ ou ao microscópio invertido quanto à presença ou ausência de coloração em cada uma das diluições. A determinação da concentração viral capaz de infectar 50% das células em cultura (CCID₅₀) foi estabelecida em cada microplaca de 96 poços, na qual foram contados os números de poços positivos por diluição, de acordo com a presença do vírus, identificados pela coloração preta. Os poços que apresentaram coloração arroxeada a preta foram considerados positivos e os que não apresentaram foram considerados negativos.

Os títulos virais foram calculados com auxílio do programa CombiStats® v5.0 pelo método Spearman & Karber e expressos em CCID₅₀ por dose humana.

4.5 Desenho experimental para determinação do título da infecção e identidade da vacina dengue para as linhagens celulares THP-1, U937 e HEK293T por método imunocolorimétrico

Após a infecção das células, as proteínas virais (proteínas do envelope) foram visualizadas utilizando do anticorpo monoclonal de camundongo específico para o

sorotipo 2 da dengue. O anticorpo é específico para o sorotipo e confirma a identidade da amostra analisada. A escolha pelo sorotipo 2 deu-se em decorrência deste ter apresentado a menor eficácia vacinal nos estudos clínicos. Foi realizada a infecção das células com incubação de um, três e sete dias.

Para as linhagens celulares THP-1 e U937 foram distribuídos 100 µL de suspensão celular na concentração de 1×10^6 células/mL por poço, em placa de 96 poços (Nunc), onde as células foram diferenciadas utilizando 100 µL de PMA na concentração de 20 ng/mL, conforme descrito no item 4.3. A suspensão celular HEK293T foi distribuída, em placa de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL em meio DMEM 10% de SFB. Após esse procedimento, as linhagens celulares foram infectadas com a vacina tetravalente da dengue nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$. Para a preparação da diluição seriada, foram utilizados os meios RPMI 1640 10% SFB para as células dTHP-1 e dU937 e DMEM 10% SFB para a célula HEK293T. Em seguida, as microplacas foram incubadas na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 por um, três e sete dias. Após cada tempo de incubação, foi realizado o ensaio de imunocolorimetria para o sorotipo 2, conforme descrito no item 4.4.3.

4.6 Determinação da curva de titulação da infecção e identidade vacinal para células HEK293T por imunocolorimetria

Foram distribuídos 100 µL de suspensão de células HEK293T contendo 3×10^5 células/mL em meio DMEM 10% de SFB em todos os poços da microplaca de 96 poços, exceto nos poços da coluna 11.

Foi realizada uma pré-diluição (10^{-1}) em megaplaca e, consecutivo a isso, foi realizada a diluição seriada com fator de diluição 1:2 até chegar à concentração de $10^{-3,4}$.

As células foram infectadas com as diluições da vacina ($10^{-1,3}$ até $10^{-3,4}$), e incubadas na estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 por três e sete dias. Após cada tempo de incubação, foi realizado o ensaio de imunocolorimetria para todos os quatro sorotipos, conforme descrito no item 4.4.3.

4.7 Avaliação da marcação intracelular do vírus vacinal por citometria de fluxo

A marcação intracelular do vírus vacinal, para a avaliação do grau de infectividade das quatro linhagens celulares - VERO, HEK293, dTHP1 e dU937- pela vacina tetravalente da dengue, foi analisada utilizando citometria de fluxo. Para a marcação intracelular do vírus foi utilizado o anticorpo monoclonal produzido em camundongo (4G2), que reconhece proteínas de envelope de *Flavivírus*, conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), gentilmente doado pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Lated) de Bio-Manguinhos.

As células foram infectadas, em placas de 96 poços, com a vacina tetravalente da dengue na diluição 10^{-1} , sendo mantido em paralelo controle de células não infectadas, pelos intervalos de três e sete dias em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$, como descrito anteriormente. Após a incubação, as placas tiveram seu meio descartado, e foram lavadas uma vez com 100 μL de PBS. Após esse procedimento, as células foram desaderidas utilizando 100 μL de tripsina/EDTA (Gibco) e, em seguida, meio 10% SFB, para cada linhagem celular, a fim de inativar a ação da tripsina. Foi realizado um pool das amostras em tubos do tipo *ependorf* e estes foram centrifugados a 367 *g* por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 500 μL de PBS/BSA 1% e centrifugados a 367 *g* durante 10 minutos, para lavagem. A seguir, as células foram fixadas com 200 μL de paraformaldeído (PFA) a 1% por 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. O PFA foi removido por centrifugação e as células foram permeabilizadas com 200 μL de solução de PBS/BSA 1% + 0,1% de Triton X-100 durante 30 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, seguida por nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 100 μL do anticorpo anti-flavivírus 4G2 conjugado com o FITC (1:50) por 30 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, exceto os tubos referentes à marcação sem anticorpo, que foram incubados sob as mesmas condições, com 100 μL de PBS/BSA 1% + 0,1% de Triton X-100. Ao final deste período, as células foram lavadas com PBS para remoção de anticorpo não ligado, com posterior centrifugação.

Por fim, as células foram ressuspensas em 300 μL de PBS para leitura em aparelho de citometria de fluxo (CytoFlex S, Beckman Coulter) e analisadas em software CytExpert. Foram realizados todos os controles de calibração e marcação para cada tipo celular. O equipamento utilizado pertence à plataforma de citometria

do IOC e é controlado diariamente, através da calibração do aparelho utilizando beads de calibração comerciais.

4.8 Imunofluorescência

Os experimentos de imunofluorescência foram realizados em lâmina com câmara de cultura de 8 poços (LAB-TEK, Nunc, Dinamarca), onde foram distribuídos 100 µL das suspensões celulares – VERO e HEK293T na concentração de 3×10^5 células/mL e células THP1 e U937 na concentração de 1×10^6 células/mL, sendo diferenciadas nas próprias lâminas três a quatro dias antes da infecção.

As células foram infectadas, com a vacina tetravalente da dengue na diluição 10^{-1} , sendo mantido em paralelo controle de células não infectadas, por três e sete dias em estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 , como descrito anteriormente. Após incubação, o meio foi descartado e as células VERO, dTHP-1 e dU937 foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS, enquanto que as células HEK293T foi lavada uma vez com 200 µL de PBS. A monocamada de células foi fixada com 100 µL de acetona 85% a $\leq -20^\circ\text{C}$ por 2 minutos à temperatura ambiente.

As células foram lavadas três vezes com 100 µL de PBS, exceto a HEK293, que foi lavada apenas uma vez. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de PBS/BSA 1% durante 20 minutos a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, para o bloqueio da membrana celular. Após esse tempo, o PBS/BSA 1% foi retirado e as células foram incubadas com 60 µL do anticorpo anti-flavivírus 4G2 conjugado com o fluorocromo Alexa-Fluor 647 por uma hora a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, na diluição 1:200 em solução de PBS/BSA 1% + 0,1% de Triton X-100, protegido da luz. Nos poços sem a marcação do anticorpo foram adicionados apenas PBS/BSA 1% + 0,1% de Triton X-100.

Em seguida, as soluções foram removidas, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS e as paredes dos poços da lâmina foram retiradas. Por fim, os núcleos das células foram corados com 10 µL da solução de Hoechst 33258 (Sigma – Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e adicionados 5 µL de óleo de imersão em cada poço. A lamínula foi posicionada em cima da lâmina e suas laterais seladas com esmalte incolor. As análises da fluorescência foram realizadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 710 e Leica TCS-SP8) com auxílio de software específico do fabricante (Zen Blue e LAS X). Os equipamentos utilizados pertencem à plataforma de microscopia confocal do IOC e ao Laboratório de Pesquisa sobre o Timo do IOC,

respectivamente. As análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Arnon Jurberg.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5 (©GraphPad Software). Os resultados foram analisados quanto a sua normalidade, se cumpriam distribuição normal (curva Gaussiana), por meio do teste Shapiro-Wilk. Para os resultados com distribuição normal, teste paramétrico, foram realizados o teste t de Student, não pareado, para comparação entre dois grupos e para diferença entre os grupos foram utilizados o teste *One-way* Anova, com pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para os resultados de potência por sorotipo, tanto para as células HEK293T quanto para as células VERO, foram realizados o teste de *Two-way* ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Para comparação entre células foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, já para analisar a diferença entre dois sorotipos na mesma célula foi utilizado o Mann – Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Além disso, para os demais ensaios foram realizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Diferenciação das linhagens celulares THP-1 e U937 em macrófagos

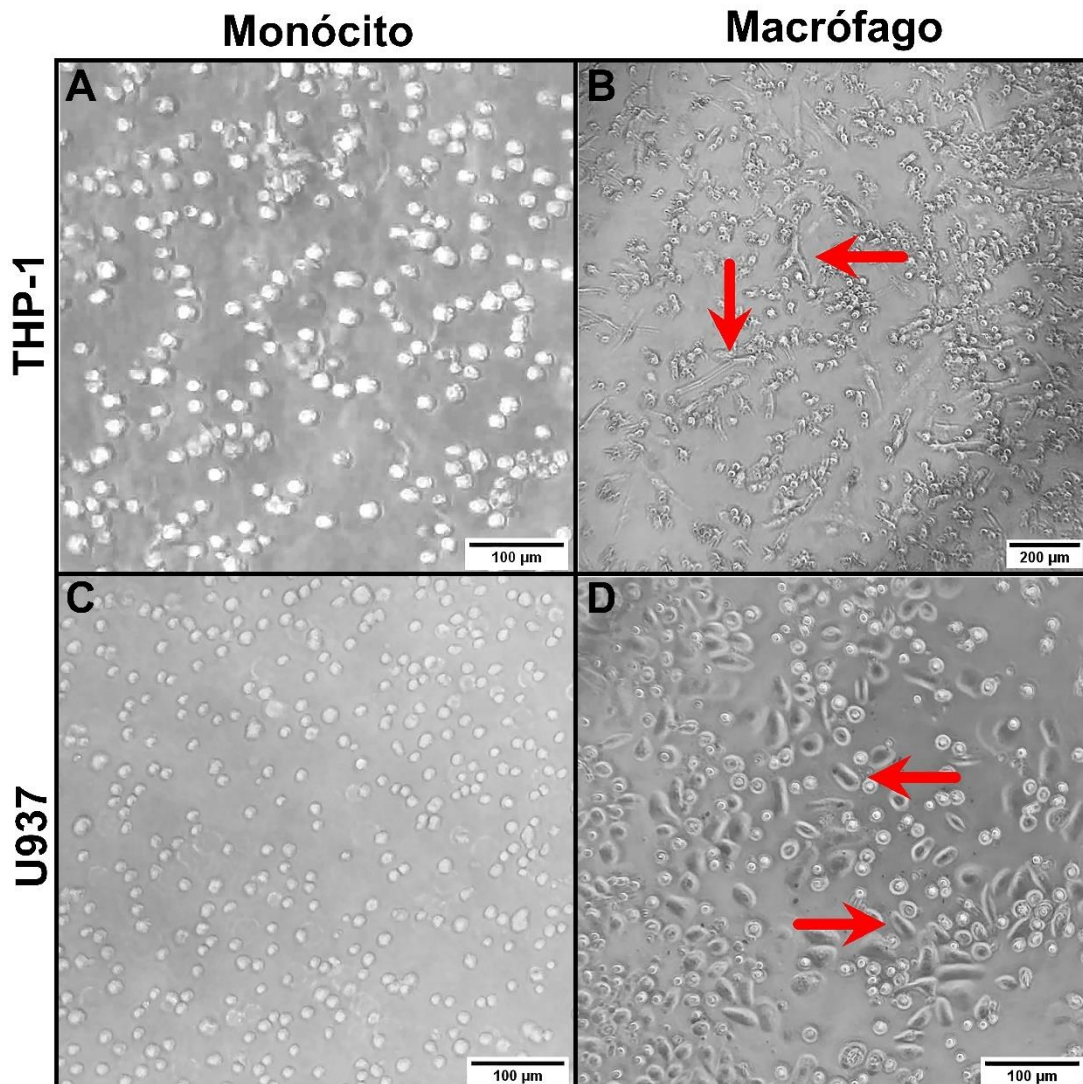
Tendo em vista o fato de macrófagos diferenciados de THP-1 e U937 serem suscetíveis ao DENV (DIAMOND *et al.*, 2000), a primeira etapa do trabalho foi verificar se o protocolo de tratamento com PMA teve êxito na diferenciação das linhagens monocíticas citadas.

Células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos, através do estímulo com PMA, foram avaliadas quanto às suas características: morfológicas, por microscopia de contraste de fase; metabólicas, pela atividade da óxido nítrico sintase (NOS) através da dosagem de NO; e fenotípicas, pela expressão da molécula de superfície de membrana CD11b.

Inicialmente foi realizada uma curva de concentrações de PMA – 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL – para avaliar qual seria a melhor condição experimental. As concentrações foram selecionadas com base nos trabalhos de Zhou e colaboradores, que utilizaram a concentração de 20 ng/mL de PMA por 48 horas (ZHOU *et al.*, 2010); Park e colaboradores que propuseram as concentrações de 10 ng/mL e 50 ng/mL de PMA durante 48 horas (PARK *et al.*, 2007).

A morfologia das células THP-1 e U937 foram compatíveis com as de macrófago, sugerindo diferenciação, no protocolo de 20ng/mL, conforme Figura 17. Houve um claro aumento no tamanho das células e uma nítida aderência à placa, com as células apresentando formas mais achatadas (Figura 17).

Figura 17 - Caracterização morfológica da diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos



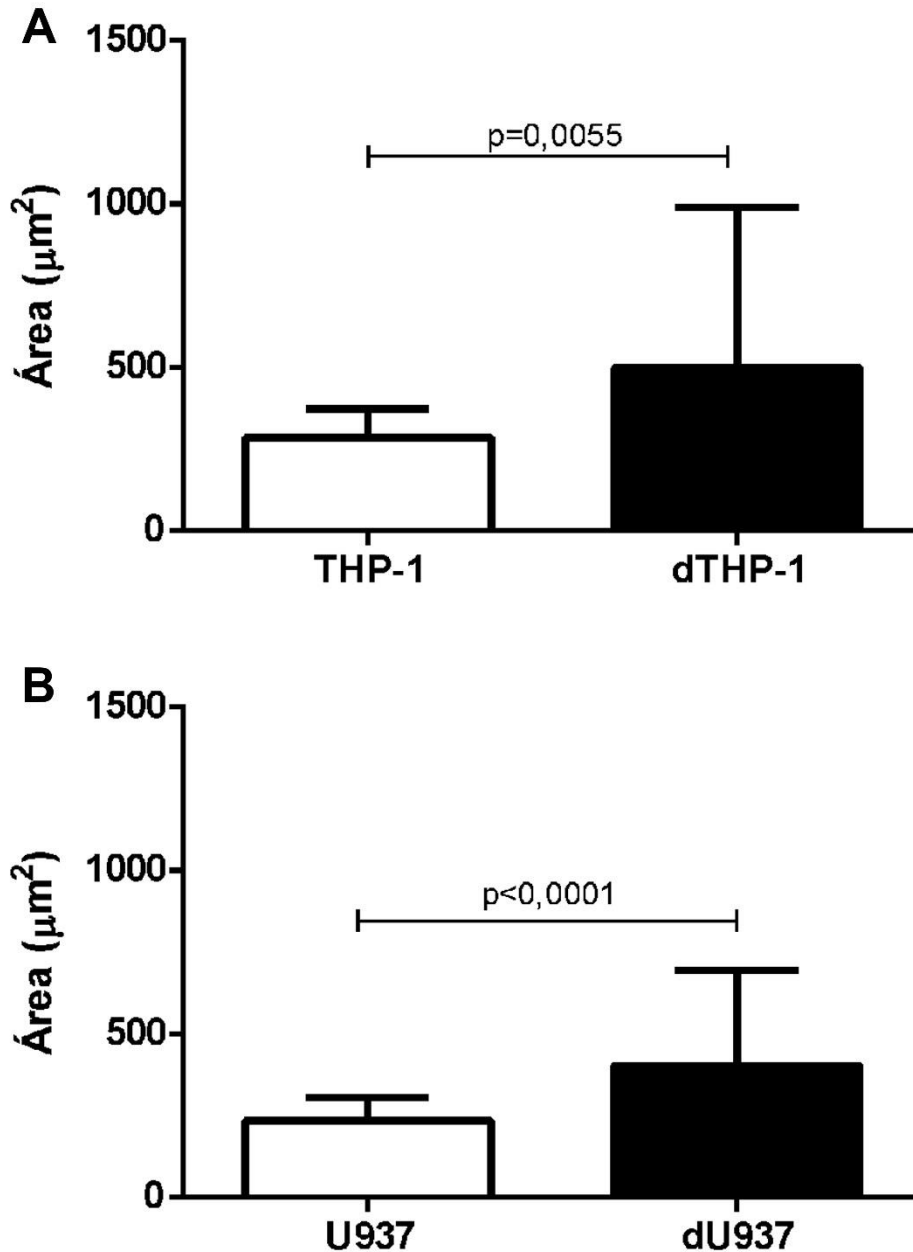
Legenda: Monócitos THP-1 (A). Células THP-1 após 48 horas de indução com 20 ng/mL de PMA (B). Monócitos U937(C). Células U937 após 48 horas de indução com 20 ng/mL de PMA (D). As setas em vermelho destacam morfologia compatível a de macrófagos. Imagens A, B, C e D representativas obtidas com microscópio Olympus, aumentos de 100X para monócitos THP-1 e U937 e U937 tratados com PMA e de 40 X para THP-1 tratados com PMA.

Fonte: (A autora, 2021).

Através da avaliação da morfologia por microscopia de contraste de fase foi verificado que houve um aumento da área citoplasmática das células THP-1 e U937 tratadas com PMA em comparação com as células não tratadas (monócitos), onde a área total da célula foi medida através do programa ImageJ (Anexo A). Desta forma, foi possível constatar que as células THP-1 e U937 tratadas com PMA na concentração de 20ng/mL apresentaram aumento significativo da área citoplasmática em relação ao grupo controle sem estímulo com PMA, configurando em ambas as

linhagens aproximadamente o dobro da área citoplasmática das células (Figura 18A e Figura 18B).

Figura 18 - Medida da área citoplasmática das células THP-1 e U937 tratadas com PMA



Legenda: Gráfico representativo com a medida da área citoplasmática das células THP-1 (A) e U-937 (B) tratadas e não tratadas com PMA. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Resultados de p-valor obtidos pelo teste T de Student, não pareado realizado para comparação das células tratadas e controle sem tratamento, dTHP-1 ($p < 0,005$) e dU937 ($p < 0,0001$).

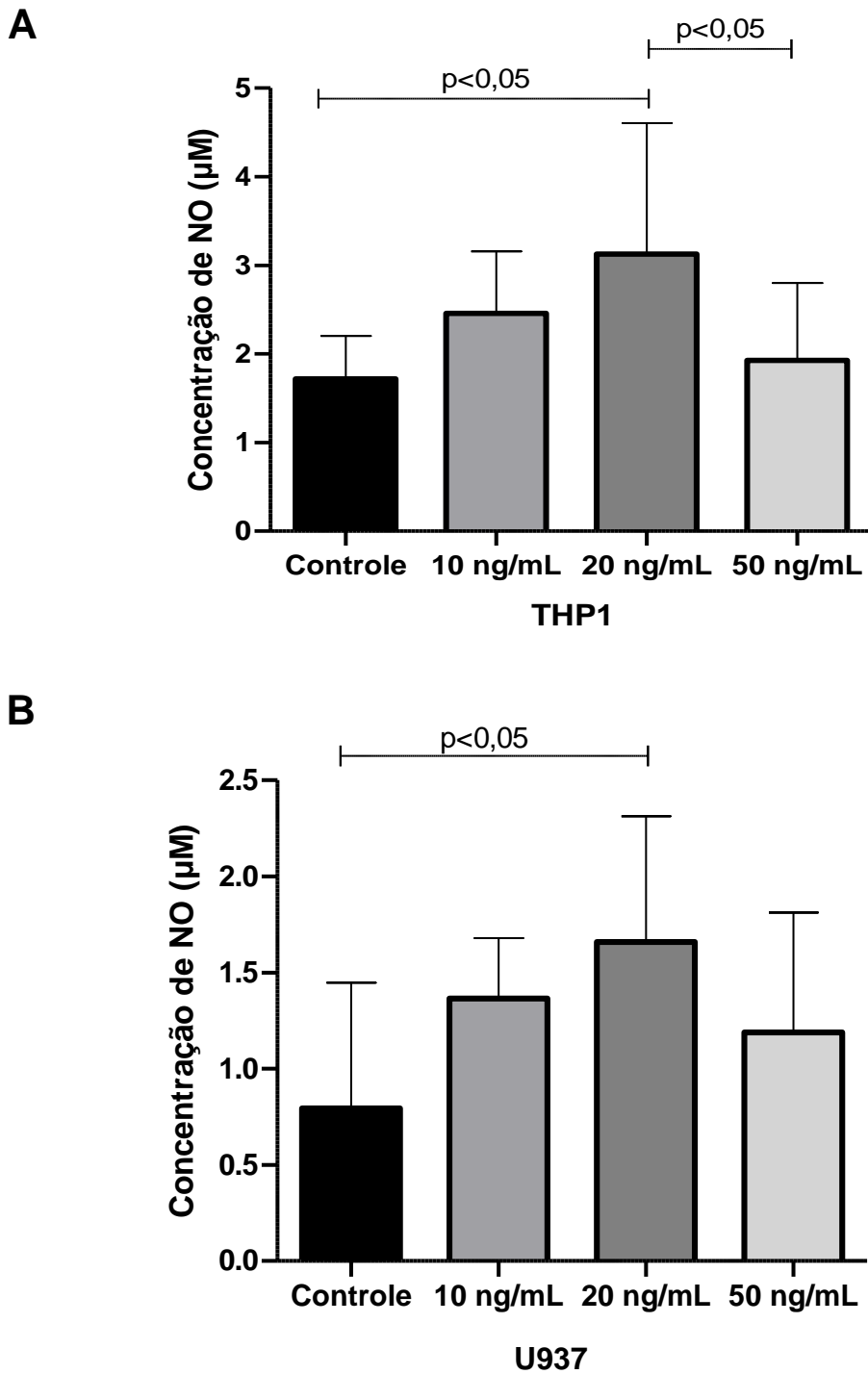
Fonte: (A autora, 2021).

Considerando a produção de nitrito, através da reação de Griess, foi avaliado o sobrenadante das células diferenciadas em macrófagos e controles. A análise

mostrou que houve uma maior quantidade de NO nas concentrações de 10 ng/mL e 20 ng/mL tanto para as células THP-1 quanto para U937 em relação ao controle não estimulado (Figura 19A e Figura 19B). A quantidade de NO observada nas células THP-1 estimuladas com PMA foi aproximadamente 1,5 vez maior e 2 vezes maior que o controle nas concentrações de 10 ng/mL e 20 ng/ml, respectivamente (Figura 19A). Enquanto que para as células U937, a produção de nitrito observada nas concentrações 10 ng/mL e 20 ng/mL foi aproximadamente 2 vezes maior que o controle (Figura 19B). Além disso, a concentração de 20 ng/mL apresentou um resultado significativamente superior quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

A concentração de 50 ng/ml, nas linhagens celulares THP-1 e U937 apresentou uma diferença de 0,21 μ M e 0,4 μ M, respectivamente, da concentração de NO em relação aos controles (Figura 19A e Figura 19B). Observamos que nas células THP-1 a quantidade de NO na concentração de 20 ng/mL mostrou-se significativamente maior que a concentração de 50 ng/mL e ao controle sem tratamento ($p < 0,05$).

Figura 19 - Produção de NO em células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos



Gráficos mostrando os níveis de produção de nitrito no sobrenadante das culturas de THP-1 e U937 sem estímulo de PMA (controle) e no sobrenadante de células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos com estímulo de 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL de PMA. THP-1 (A) e U937 (B); média \pm desvio padrão, $n = 12$ (derivados de quatro experimentos independentes realizados em triplicata). Resultados de p-valor obtidos pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Valor de significância de $p < 0,05$.

Fonte: (A autora, 2021).

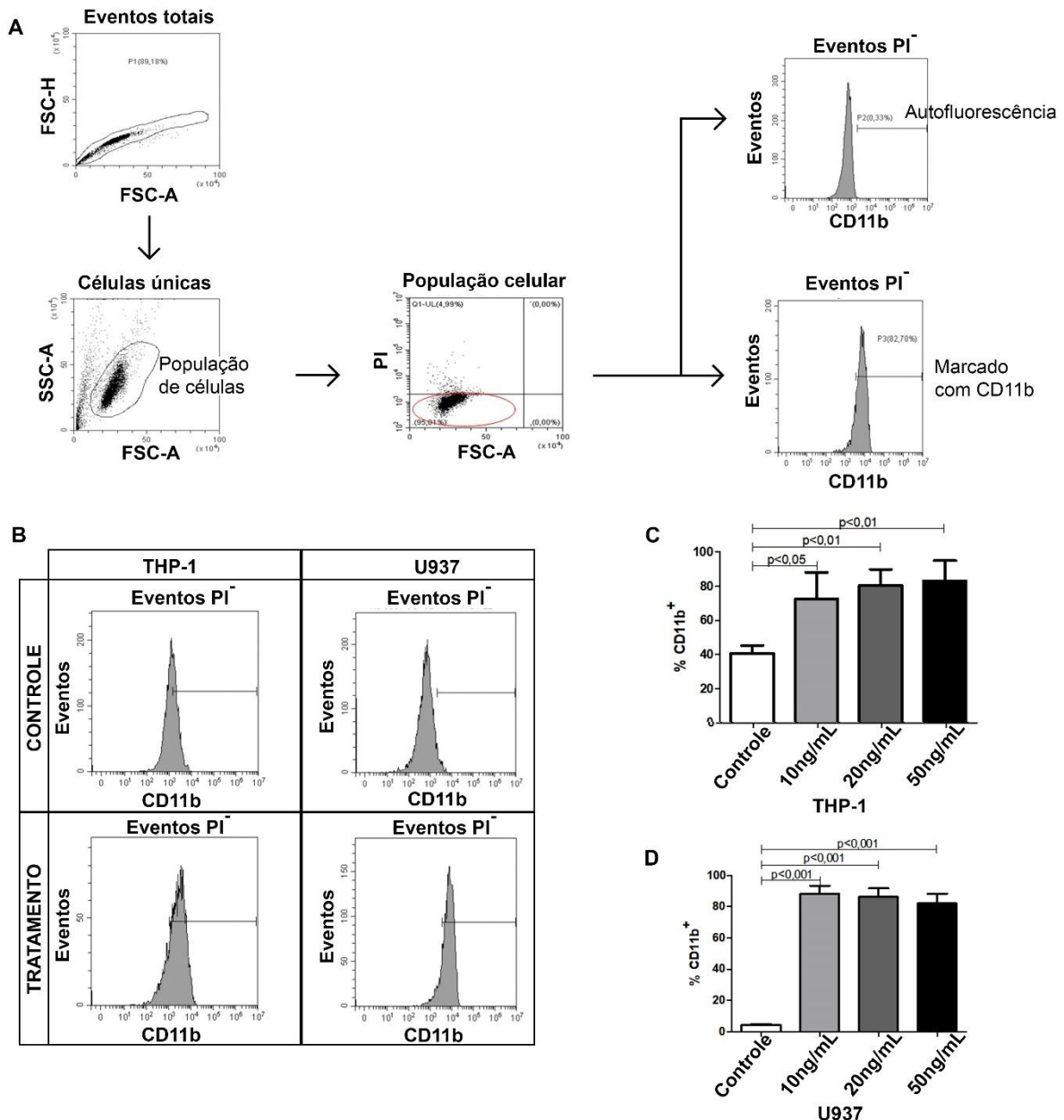
Nessa etapa para avaliarmos fenotipicamente a diferenciação de macrófagos, bem como a citotoxicidade do indutor de diferenciação utilizado, PMA, foram realizados experimentos com o marcador de superfície CD11b e o marcador de viabilidade iodeto de propídio (PI), por citometria de fluxo.

Na Figura 20A apresentamos a estratégia de “*gate*” utilizada para avaliação da expressão do receptor CD11b nas células diferenciadas em macrófagos. Os resultados obtidos evidenciaram a expressão do marcador CD11b nas linhagens celulares THP-1 e U937 quando diferenciadas em macrófagos com as diferentes concentrações de PMA testadas (Figura 20C e Figura 20D). Visto que a distribuição da expressão de CD11b nas populações celulares de THP-1 e U937 seguiram uma curva gaussiana (Figura 20B), foi realizado um teste paramétrico t de Student e observou-se que houve diferenças estatísticas entre as concentrações de PMA em relação ao controle (Figura 20C e Figura 20D).

Nas células THP-1 as concentrações de 20 e 50 ng/mL de PMA apresentaram maior expressão do marcador CD11b, com valor médio de aproximadamente 80% das células e a concentração de 10 ng/mL com cerca de 75% (Figura 20C). A expressão de CD11b no controle (células não diferenciadas) foi cerca de 40%.

Já nas células U937 o aumento observado na expressão de CD11b foi similar para as três concentrações de PMA utilizadas com aproximadamente 86%. Contudo, diferente das células THP-1, as células U937 não diferenciadas, ou seja, que não receberam estímulo de PMA, apresentaram baixa expressão de CD11b, quase indetectável (3,99%) (Figura 20D).

Figura 20 - Avaliação da expressão do receptor CD11b nas células THP-1 e U937 diferenciadas em macrófagos após tratamento com PMA



Legenda: Figura representativa da estratégia de *gate*, com células U937, utilizada na análise. O passo inicial foi a exclusão de *doublets* utilizando o *dot plot* FSC-H x FSC-A. Após foi realizado um novo *gate* para definir a população de células de acordo com os critérios de granulosidade (SSC) x tamanho (FSC). Por último, foram removidos os eventos PI positivos, ou seja, células não viáveis, para estabelecer o gate final, utilizado no histograma de intensidade de fluorescência para CD11b (FITC) (A). Histogramas representativos da expressão de CD11b em células THP-1 e U937 tratadas e não tratadas com diferentes concentrações de PMA, evidenciando uma distribuição populacional gaussiana (B). Gráfico da expressão do marcador de superfície CD11b nas células THP-1 (C) e U937 (D) tratadas com PMA nas concentrações 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL por 48h. Resultados de p-valor obtidos pelo teste t de Student. Valor de significância de $p < 0,05$. $n = 3$.

Fonte: (A autora, 2021).

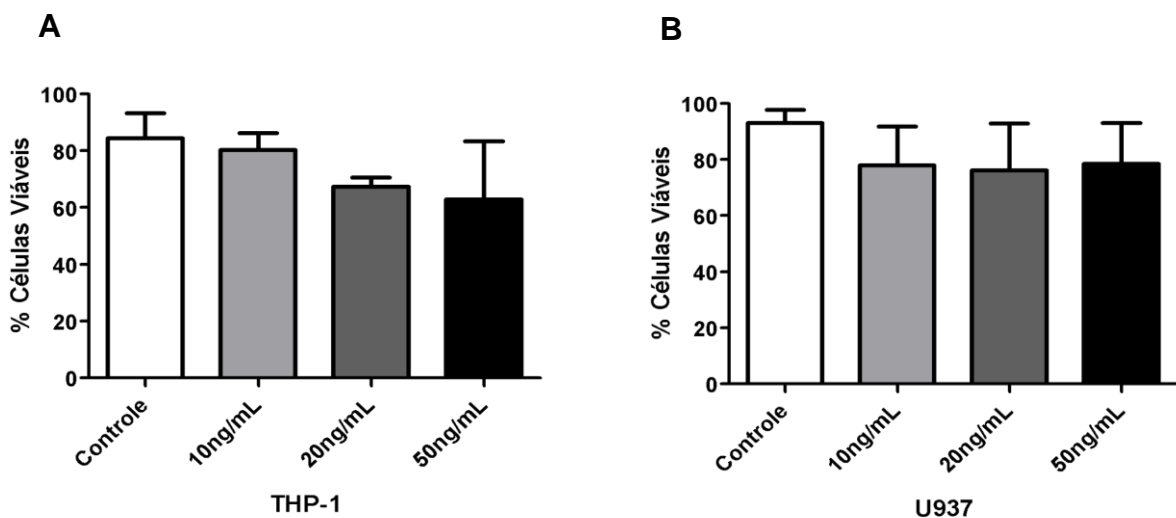
A decisão pela melhor concentração do estímulo por PMA deveria atender não somente os critérios de morfologia, metabolismo e fenotipagem típicas de macrófagos,

mas também a citotoxicidade desse estímulo foi considerada. Nesse contexto, após todo o procedimento de diferenciação, as células foram marcadas com PI no momento da análise por citometria. Foi observada uma menor viabilidade das células THP-1 quando estimuladas com a concentração de 50 ng/mL (63%) de PMA em comparação às demais concentrações de 10 ng/mL (80%) e 20ng/mL (67%). O controle apresentou 84% de células viáveis (Figura 21A).

Já as células U937, quando estimuladas com PMA nas três concentrações utilizadas, não apresentaram uma diferença na viabilidade celular. A porcentagem de células viáveis nos grupos tratados com PMA foi de aproximadamente 80% enquanto que no controle foi de 93% (Figura 21B).

Os resultados obtidos para viabilidade tanto em THP-1 quanto em U937 sugerem que as concentrações mais baixas (10 ng/mL e 20 ng/mL) de PMA apresentaram baixa citotoxicidade, visto que não houve diferença estatística (Figura 21). A concentração de 50 ng/mL, entretanto, nas células THP-1 apresentou uma alta variabilidade nas respostas com alguns experimentos com maior citotoxicidade (Figura 21A).

Figura 21 - Gráfico mostrando a viabilidade das células THP-1 e U937 tratadas com diferentes concentrações de PMA



Viabilidade das células THP-1 (A) e U937 (B) tratadas com PMA nas concentrações 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL por 48h e posterior descanso de 24h. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Resultados de p-valor obtidos pelo teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn e Mann-Whitney. Valor de significância de $p < 0,05$. $n = 3$.

Fonte: (A autora, 2021).

Com base nos resultados obtidos, foi demonstrado pelas análises morfológicas, metabólicas e fenotípicas, que as células THP-1 e U937 quando diferenciadas apresentaram: alteração morfológica condizente com perfil de macrófagos, identificada pela microscopia de contraste de fase; aumento na atividade de NOS mais evidente na concentração de 20ng/mL; e aumento significativo da expressão do marcador de superfície CD11b.

Nas células THP-1 as concentrações de 20 e 50 ng/mL foram que induziram maior porcentagem de células positivas para CD11b, entretanto na avaliação da viabilidade celular a concentração de 50 ng/mL mostrou-se mais tóxica. Já nas células U937 as concentrações de 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL de PMA apresentaram aproximadamente as mesmas porcentagens de marcação de CD11b e viabilidade celular.

Diante destes achados, o protocolo de 20 ng/mL foi considerado como aquele que demonstrou maior eficiência na diferenciação das linhagens celulares THP-1 e U937 em macrófagos e, por este motivo, foi utilizado nos experimentos seguintes.

5.2 Avaliação da infectividade por imunocolorimetria das células dTHP-1, dU937 e HEK293T

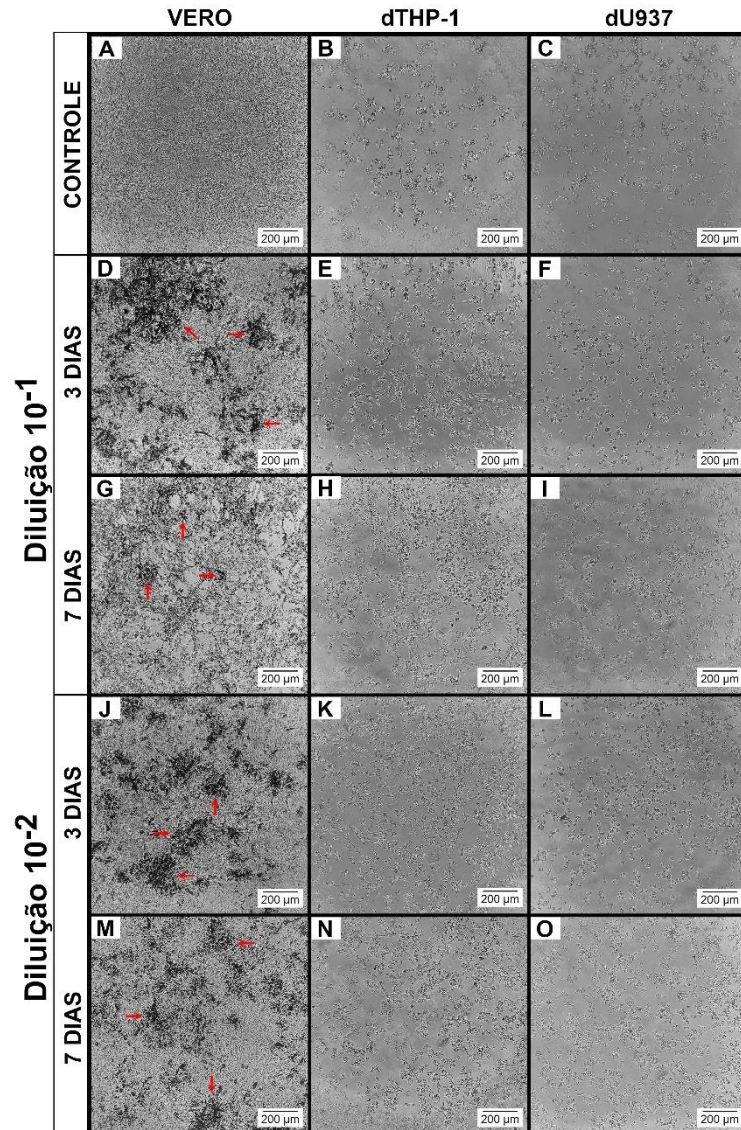
Para verificar a infectividade da vacina tetravalente da dengue nas células dTHP-1, dU937 e HEK293T foi realizado um ensaio preliminar somente para o sorotipo 2 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$, nos tempos de um, três e sete dias. Duas das diluições escolhidas eram as pré-diluições dos ensaios com célula VERO (10^{-1} e 10^{-2}), enquanto a terceira era correspondente à primeira diluição ($10^{-2,6}$) do ensaio do produtor. A célula VERO foi utilizada como controle nos ensaios e infectada nas mesmas condições das outras células.

Após um dia de incubação, as células não apresentaram coloração em nenhuma das três diluições, ou seja, o resultado foi negativo para infecção, inclusive as células VERO.

Nos experimentos com as células dTHP-1 e dU937, após incubação com três e sete dias, não foi possível observar a presença do vírus através da coloração escura para o sorotipo 2, ou seja, todos os poços estavam negativos, dentro dessas condições experimentais (Figura 22). No anexo B estão apresentados os resultados

de infecção com o vírus vacinal na diluição $10^{-2,6}$. As células VERO, utilizadas como controle positivo, foram positivas para todas as concentrações testadas (Figura 22).

Figura 22 - Infecção com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue em células dTHP1, dU937 e VERO por imunocolorimetria

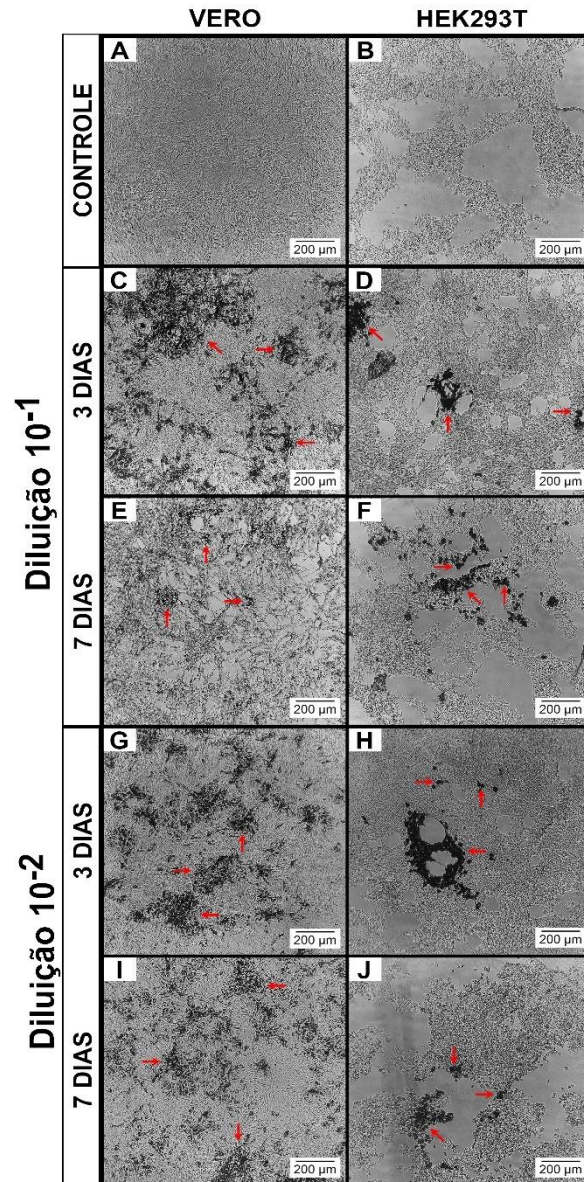


Legenda: Células VERO, dTHP-1 e dU937 infectadas com o vírus vacinal da dengue para o sorotipo 2 nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} durante três e sete dias de incubação, por imunocolorimetria. Células VERO controle (A), células dTHP-1 controle (B) e células U937 controle (C). Infecção na diluição 10^{-1} por 3 dias células VERO (D), células dTHP-1 (E) e dU937 (F); para 7 dias células VERO (G), células dTHP-1 (H) e dU937 (I) coradas com mAb anti-DENV-2. Infecção na diluição 10^{-2} por 3 dias células VERO (J), células dTHP-1 (K) e dU937 (L); para 7 dias células VERO (M), células dTHP-1 (N) e dU937 (O); coradas com mAb anti-DENV-2. Setas vermelhas indicam infecção viral. Imagens representativas obtidas no microscópio Olympus com ampliação de 100X.
Fonte: (A autora, 2021).

Já com as células HEK293T foi possível observar a infecção viral para o sorotipo 2 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} (Figura 23) e $10^{-2,6}$ (Anexo B) nos tempos de três e

sete dias, sendo evidenciada pela coloração escura, quando comparadas às células não infectadas. As células VERO, utilizadas como controle positivo, foram positivas para todas as concentrações testadas (Figura 23 e Anexo B).

Figura 23 - Infecção com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue em células HEK293T e VERO por imunocolorimetria



Legenda: Células VERO e HEK293T infectadas com o vírus vacinal da dengue para o sorotipo 2 nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} durante três e sete dias de incubação, por imunocolorimetria. Células VERO controle (A). Células VERO infectadas na diluição 10^{-1} por 3 dias (C) e 7 dias (E), coradas com mAb anti-DENV-2. Células HEK293T de controle (B). Células HEK293T infectadas na diluição 10^{-1} por 3 dias (D) e 7 dias (F), coradas com mAb anti-DENV-2. Células VERO infectadas na diluição 10^{-2} por 3 dias (G) e 7 dias (I), coradas com mAb anti-DENV-2. Células HEK293T infectadas na diluição 10^{-2} por 3 dias (H) e 7 dias (J), coradas com mAb anti-DENV-2. Setas vermelhas indicam infecção viral. Imagens representativas obtidas no microscópio Olympus com ampliação de 100X.

Fonte: (A autora, 2021).

5.3 Determinação de uma curva dose-resposta para a vacina CYD-TDV nas células HEK293T

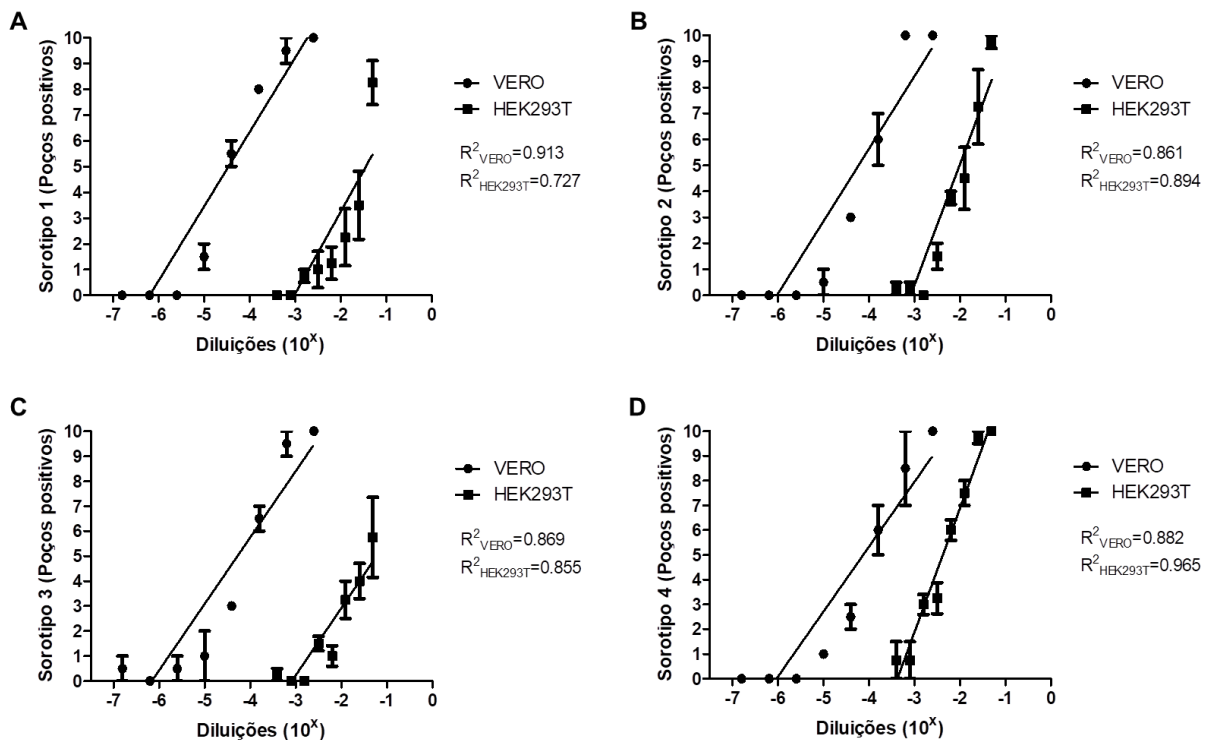
A próxima etapa foi obter uma curva de diluição da vacina, para investigar a exequibilidade de um ensaio de curva dose-resposta para a vacina CYD-TDV utilizando as células HEK293T por imonocolorimetria. Novamente, as células VERO foram utilizadas como controle positivo.

As células HEK293T foram expostas a diferentes diluições da vacina de $10^{-1,3}$ a $10^{-3,4}$, seguindo um fator de diluição de 1: 2, enquanto as células VERO foram submetidas a diluições de $10^{-2,6}$ a $10^{-6,8}$, com um fator de diluição de 1: 4, durante três dias e sete dias de incubação. Neste conjunto de experimentos, os anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo determinaram separadamente o grau de infectividade da vacina em células HEK293T e no controle positivo (VERO).

Observamos infecção das células HEK293T, determinada pela presença de coloração escura após incubação com anticorpo monoclonal específico para cada sorotipo da dengue (poços positivos), apenas nas diluições mais concentradas da vacina. Embora as diluições da vacina para infectar as células VERO fossem menos concentradas, as células HEK293T mostraram suscetibilidade, em nossas condições experimentais, à infecção com essa vacina.

As curvas de dose-resposta e o cálculo do coeficiente de determinação da equação de regressão de respostas infecciosas em células HEK293T e controle para cada sorotipo em três dias estão demonstradas na Figura 24 (sorotipo 1 $R^2_{\text{VERO}}=0,913$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,727$, Figura 24A; sorotipo 2 $R^2_{\text{VERO}}=0,861$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,894$, Figura 24B, sorotipo 3 $R^2_{\text{VERO}}=0,869$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,855$, Figura 24C e sorotipo 4 $R^2_{\text{VERO}}=0,882$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,965$, Figura 24D).

Figura 24 - Curva dose-resposta para cada sorotipo da vacina dengue em células HEK293T e VERO, após três dias de infecção

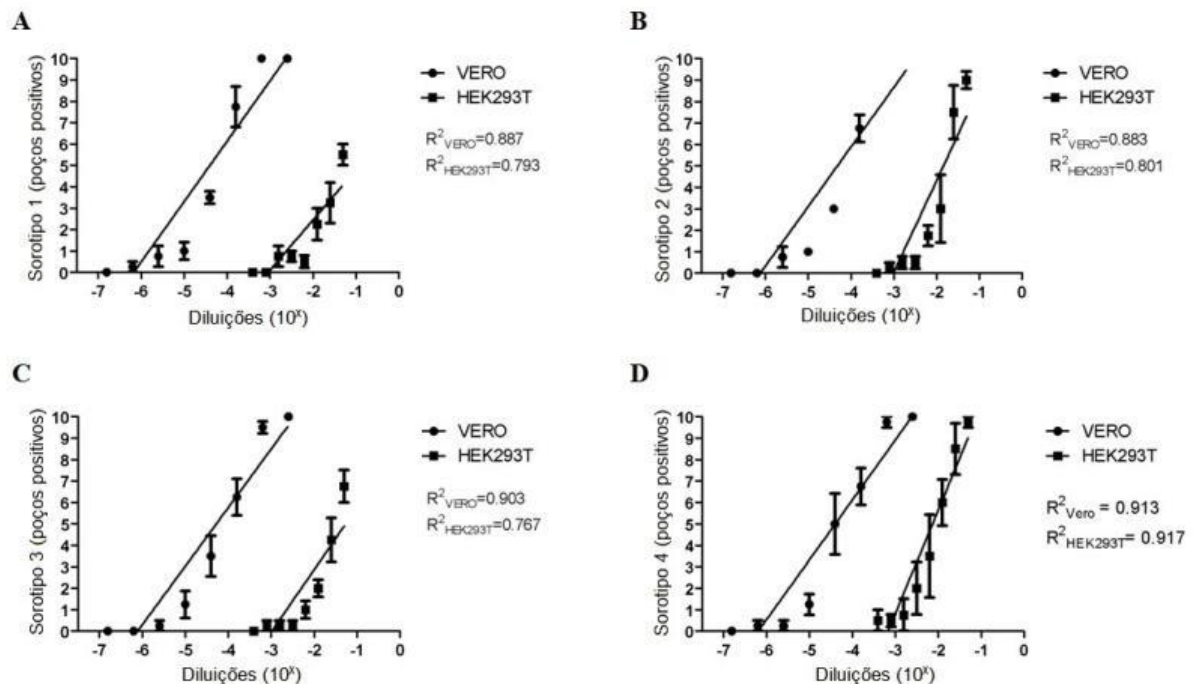


Legenda: Células VERO como controle positivo (círculo preto) e HEK293T (quadrado preto) infectadas com vacina contra dengue em diluições de $10^{-2,6}$ a $10^{-6,8}$, fator de diluição 1: 4 e $10^{-1,3}$ a $10^{-3,4}$, fator de diluição 1: 2, respectivamente, analisadas por ensaio de imunocolorimetria após 3 dias de incubação. A infecção dos sorotipos 1 (A), sorotipo 2 (B), sorotipo 3 (C) e sorotipo 4 (D) foi avaliada pela presença de coloração após incubação com anticorpo específico para cada sorotipo - poços positivos. Regressão linear (linhas retas) de respostas infecciosas em células VERO e HEK293T para o sorotipo 1 ($R^2_{VERO}=0,913$ e $R^2_{HEK293T}=0,727$), sorotipo 2 ($R^2_{VERO}=0,861$ e $R^2_{HEK293T}=0,894$), sorotipo 3 ($R^2_{VERO}=0,869$ e $R^2_{HEK293T}=0,855$) e sorotipo 4 ($R^2_{VERO}=0,882$ e $R^2_{HEK293T}=0,965$). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. n = 4.

Fonte: (A autora, 2021).

Já para sete dias estão demonstradas na Figura 25 (sorotipo 1 $R^2_{VERO}=0,887$ e $R^2_{HEK293T}=0,793$, Figura 25A; sorotipo 2 $R^2_{VERO}=0,883$ e $R^2_{HEK293T}=0,801$, Figura 25B, sorotipo 3 $R^2_{VERO}=0,903$ e $R^2_{HEK293T}=0,767$, Figura 25C e sorotipo 4 $R^2_{VERO}=0,913$ e $R^2_{HEK293T}=0,917$, Figura 25D).

Figura 25 - Curva dose-resposta para cada sorotipo da vacina dengue em células HEK293T e VERO, após sete dias de infecção



Legenda: Células VERO como controle positivo (círculo preto) e HEK293T (quadrado preto) infectadas com vacina contra dengue em diluições de $10^{-2,6}$ a $10^{-6,8}$, fator de diluição 1: 4 e $10^{-1,3}$ a $10^{-3,4}$, fator de diluição 1: 2, respectivamente, analisadas por ensaio de imunocolorimetria após 7 dias de incubação. A infecção dos sorotipos 1 (A), sorotipo 2 (B), sorotipo 3 (C) e sorotipo 4 (D) foi avaliada pela presença de coloração após incubação com anticorpo específico para cada sorotipo - poços positivos. Regressão linear (linhas retas) de respostas infecciosas em células VERO e HEK293T para o sorotipo 1 ($R^2_{\text{VERO}}=0,887$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,793$), sorotipo 2 ($R^2_{\text{VERO}}=0,883$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,801$), sorotipo 3 ($R^2_{\text{VERO}}=0,903$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,767$) e sorotipo 4 ($R^2_{\text{VERO}}=0,913$ e $R^2_{\text{HEK293T}}=0,917$). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. n = 4.

Fonte: (A autora, 2021).

Todos os resultados de regressão foram maiores que 70 por cento de probabilidade em células HEK293T e apresentaram linearidade semelhante às células VERO, apoiando assim a idéia de construir uma curva de dose-resposta da vacina contra dengue em células HEK293T.

5.4 Avaliação da potência para os diferentes sorotipos da vacina tetravalente da dengue em células HEK293T e VERO

Uma característica importante para estimar a qualidade de uma vacina, seja na fase de desenvolvimento ou de controle, é a verificação da potência. Portanto, a etapa final desta configuração experimental foi calcular as potências estimadas entre os quatro diferentes sorotipos na mesma linhagem celular e comparar os resultados

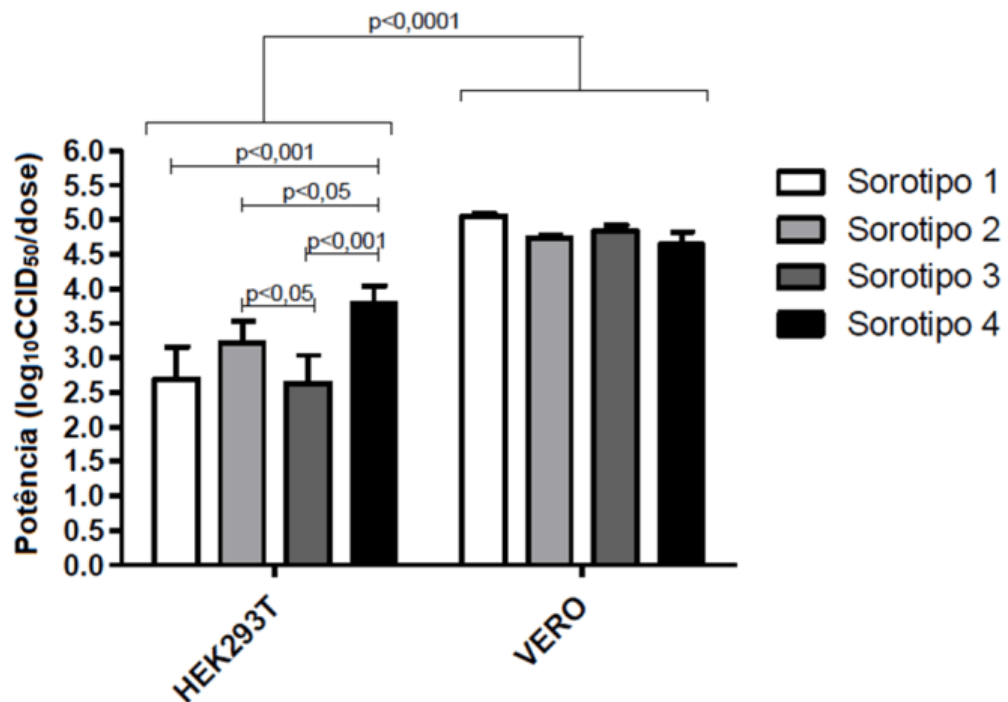
obtidos nas células HEK293T com o das células VERO (controle positivo), após três e sete dias de incubação.

Com três dias de infecção pelo vírus vacinal, a potência calculada, em \log_{10} CCID₅₀/dose, em células HEK293T para cada sorotipo foi de $2,69 \pm 0,46$ para o sorotipo 1 (CYD-1), $3,21 \pm 0,31$ para o sorotipo 2 (CYD-2), $2,63 \pm 0,40$ para o sorotipo 3 (CYD-3) e $3,78 \pm 0,25$ para o sorotipo 4 (CYD-4), conforme Figura 26. Uma diferença altamente significativa ($p < 0,001$) na potência estimada para o sorotipo 4 em relação aos demais sorotipos foi detectada nos ensaios utilizando as células HEK293T após três dias de incubação com os vírus vacinais. A potência estimada do sorotipo 4 quando comparada aos sorotipos 1 e 3 foi de, aproximadamente, 1 \log_{10} CCID₅₀/dose acima. Além disso, o sorotipo 2 apresentou uma potência estimada significativamente maior do que a do sorotipo 3 ($p < 0,05$). Suma, as células HEK293T mostraram diferenças na potência entre os sorotipos (Figura 26).

Em contraponto, as células VERO não apresentaram diferenças significativas entre as potências para cada sorotipo, com valores estimados de $5,05 \pm 0,04$ (CYD-1), $4,74 \pm 0,04$ (CYD-2), $4,83 \pm 0,09$ (CYD-3) e $4,64 \pm 0,18$ (CYD-4) (Figura 26).

Além disso, foi observado que as células HEK293T apresentaram potências estimadas menores que as da célula controle (VERO).

Figura 26 - Comparação da infectividade de cada sorotipo do vírus vacinal em células HEK293T e VERO, após três dias de incubação



Legenda: Média das potências, medida em \log_{10} CCID₅₀/dose, por sorotipo em células HEK293T e VERO após 3 dias. As barras representam os resultados de potência média de cada sorotipo: 1 (2,69 e 5,05 – barra branca), 2 (3,21 e 4,74 – barra cinza claro), 3 (2,63 e 4,83 – barra cinza escuro) e 4 (3,78 e 4,64 – barra preta). Resultados de p-valor obtidos pelo teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Valor de significância de $p < 0,05$. $n=4$.

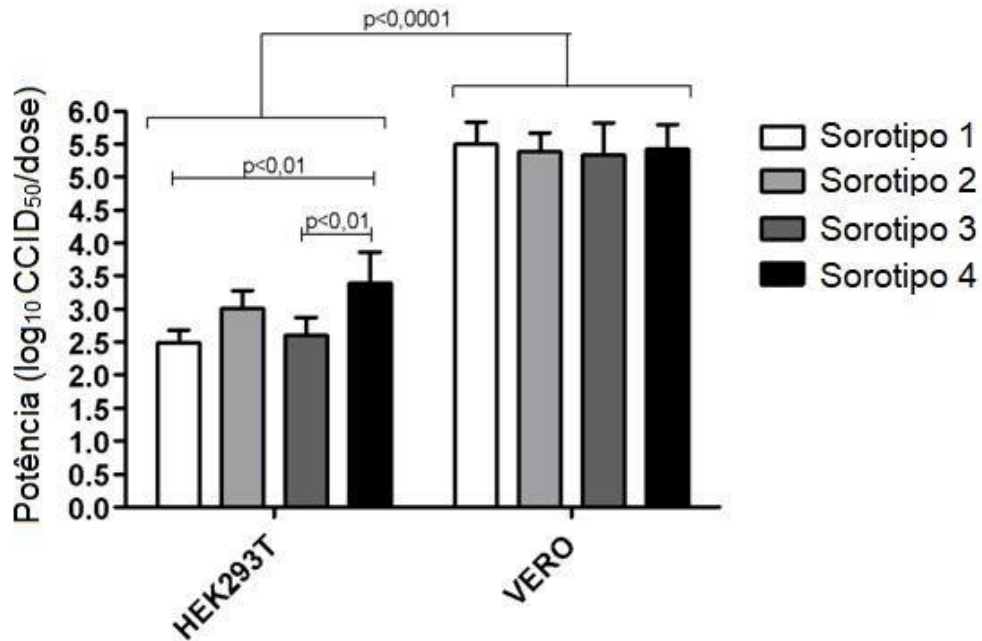
Fonte: (A autora, 2021).

Em sete dias de infecção pelo vírus vacinal, o resultado da potência calculada, em \log_{10} CCID₅₀ /dose, em células HEK293T para cada sorotipo foi $2,49 \pm 0,19$ (CYD-1), $3,01 \pm 0,26$ (CYD-2), $2,6 \pm 0,27$ (CYD-3) e $3,39 \pm 0,46$ (CYD-4). Novamente, foi possível constatar uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre o sorotipo 4 e os demais. Após sete dias, o sorotipo 4 apresenta nas células HEK293T uma potência estimada de cerca de 1 \log_{10} CCID₅₀/dose a mais do que os sorotipos 1 e 3 (Figura 27). O sorotipo 2 apresentou resultado de potência próximo ao obtido com o sorotipo 4, entretanto, não observamos diferença estatística em relação a esse sorotipo com sete dias (Figura 27).

Já as células VERO não demonstraram diferenças significativas entre as potências estimadas de cada sorotipo ($5,49 \pm 0,33$ (CYD-1), $5,38 \pm 0,28$ (CYD-2), $5,34 \pm 0,47$ (CYD-3) e $5,42 \pm 0,37$ (CYD-4)) (Figura 27).

Ademais, foi observado que as células HEK293T apresentaram potências estimadas menores que as da célula controle (VERO) ($p < 0,0001$) (Figura 27).

Figura 27 - Comparação da infectividade de cada sorotipo do vírus vacinal em células HEK293T e VERO, após sete dias de incubação



Legenda: Média das potências, em \log_{10} CCID₅₀/dose, para cada sorotipo em células HEK293T e VERO após sete dias de incubação. As barras representam os resultados de potência média de cada sorotipo: 1 (2,49 e 5,49 – barra branca), 2 (3,01 e 5,38 – barra cinza clara), 3 (2,60 e 5,34 – barra cinza escura) e 4 (3,39 e 5,42 – barra preta). Resultados de p-valor obtidos pelo teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni realizado para comparação de grupo e foram observadas diferenças significativas entre os tipos de células ($p < 0,0001$) e os sorotipos 4 e 3 ($p < 0,01$) e sorotipos 4 e 1 ($p < 0,01$) avaliados nas células HEK293T. $n=4$

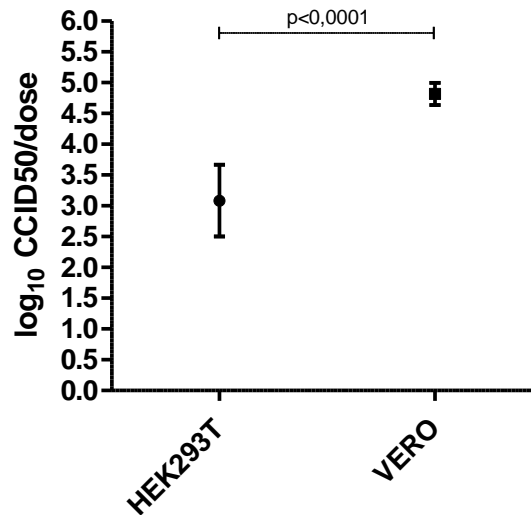
Fonte: (A autora, 2021).

5.5 Determinação da potência da vacina tetravalente para a dengue utilizando células HEK293T e VERO

Após definidos os resultados de potências da vacina tetravalente para cada sorotipo vacinal, confirmando a identidade, foi determinada a potência geral da vacina nas duas linhagens celulares (HEK293T e VERO) para avaliação das respostas nos diferentes tempos, três e sete dias, de incubação com o vírus vacinal.

Após três dias de incubação, as células HEK293T demonstraram uma potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID₅₀/dose, de $3,084 \pm 0,58$, enquanto em células VERO a potência média foi de $4,816 \pm 0,18$, conforme ilustrado na Figura 28. Ainda, quando comparadas as médias obtidas, foi vista uma diferença significativa entre os resultados das duas células (Figura 28).

Figura 28 - Potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID₅₀/dose, determinada em células HEK293T e VERO após três dias de incubação com o vírus vacinal

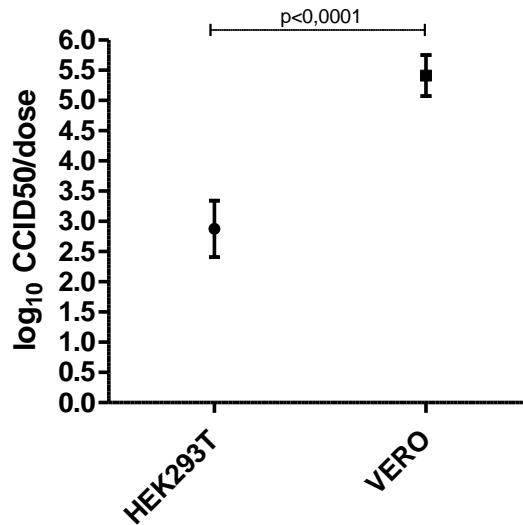


Legenda: Média das potências em células HEK293T (3,084) representada pelo círculo e a média em células VERO (4,816) pelo quadrado. As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada célula (0,58 e 0,18, para HEK293T e VERO respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de Student. Valor de significância de $p < 0,05$.

Fonte: (A autora, 2021).

Já com sete dias de incubação, a potência vacinal média obtida em células HEK293T foi de $2,876 \pm 0,46$, enquanto em células VERO a potência média foi de $5,413 \pm 0,34$, conforme ilustrado na Figura 29. Ainda, quando comparadas as médias obtidas, também foi vista uma diferença significativa entre os resultados das duas células (Figura 29).

Figura 29 - Potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID₅₀/dose, determinada em células HEK293T e VERO após sete dias de incubação com o vírus vacinal

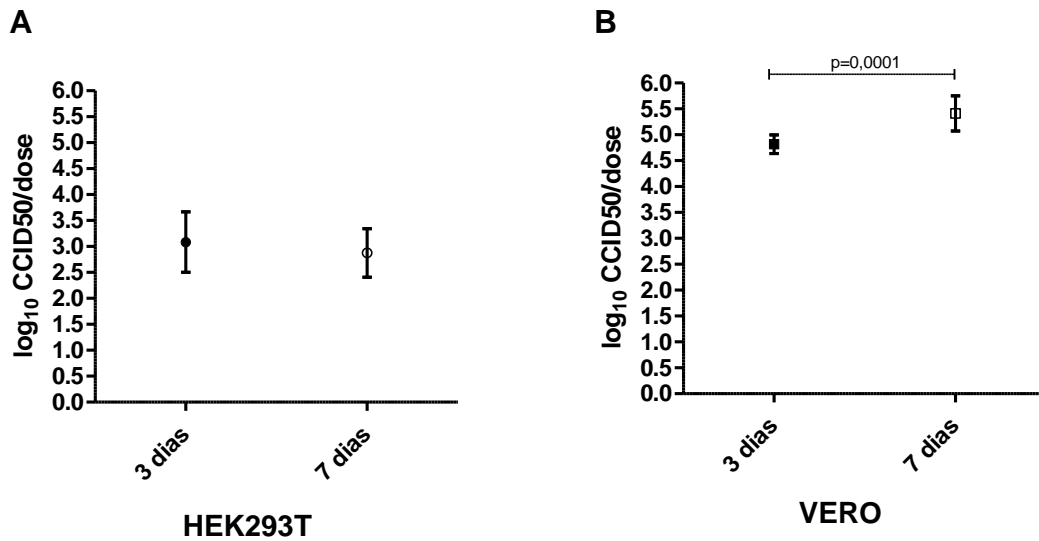


Legenda: Média das potências em células HEK293T (2,876) representada pelo círculo e a média em células VERO (5,413) pelo quadrado. As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada célula (0,46 e 0,34, para HEK293T e VERO respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de Student. Valor de significância de $p < 0,05$.

Fonte: (A autora, 2021).

Como observado, não houve diferença entre as potências calculadas em células HEK293T nos intervalos de três e sete dias (Figura 30A). Contudo, em células VERO houve um aumento significativo ($p = 0,0001$) na potência medida após sete dias de incubação quando comparada ao tempo de três dias (Figura 30B).

Figura 30 - Potências médias, medida em \log_{10} CCID₅₀/dose, estimadas em células HEK293T e VERO após três e sete dias de incubação com o vírus vacinal



Legenda: Média das potências em células HEK293T após três dias (3,084 - círculo preto) e sete dias (2,876 – círculo branco). As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada tempo (0,58 e 0,46, para três e sete dias respectivamente). Não houve diferença significativa entre as médias (A). Média das potências em células VERO após três dias (4,816 - quadrado preto) e sete dias (5,413 – quadrado branco). As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada tempo (0,18 e 0,34, para três e sete dias respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de Student com valor de significância de $p < 0,05$ (B).

Fonte: (A autora, 2021).

5.6 Detecção da infectividade da vacina tetravalente da dengue em células HEK293T, dTHP-1, dU937 e VERO por metodologia alternativa

Nessa etapa do trabalho, foi testada uma possibilidade de se utilizar a citometria de fluxo e/ou a imunofluorescência por microscopia confocal para quantificar a infectividade da vacina tetravalente da dengue nas diferentes linhagens de células estudadas, realizando uma marcação intracelular com um anticorpo específico para proteína de envelope de *Flavivirus* (4G2).

5.6.1 Determinação da infectividade por Citometria de Fluxo

Para definição do título do anticorpo (Ac) 4G2, foi utilizada a linhagem celular VERO, que sabidamente apresenta alta positividade para infecção pelo vírus vacinal. Para isso, a célula VERO foi infectada com a vacina tetravalente da dengue na diluição

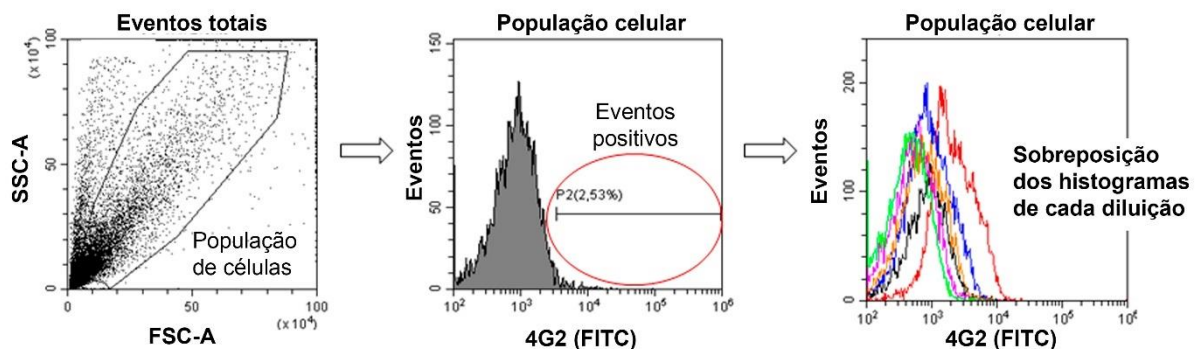
10^{-1} , após incubação de sete dias foi realizada a titulação do anticorpo 4G2 nas concentrações 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/500 (Figura 32).

A Figura 31 mostra a estratégia de “gate” utilizada para determinar a porcentagem da marcação com o anticorpo 4G2 nas células infectadas e no controle sem infecção nas diferentes concentrações.

Nas células VERO infectadas foi possível observar a marcação positiva de 4G2 para todas as diluições testadas (Figura 32). Além disso, observamos que o percentual de células positivas para 4G2 diminuíram com o aumento da diluição do anticorpo. Na concentração de 1/20 o percentual da marcação de 4G2 em células infectadas foi cerca de 75%, entretanto o controle apresentou um percentual de 27% de positividade para 4G2, sugerindo marcações inespecíficas. Já a concentração de 1/50 apresentou um percentual de aproximadamente 50% de positividade para o 4G2 nas células infectadas com o vírus vacinal, contudo o controle não apresentou marcação inespecífica, com valor percentual de cerca de 4,4% (Figura 32F).

Diante dos resultados, constatou-se como melhor diluição de trabalho para as marcações intracelulares de proteína E viral o título de anticorpo 1/50, na qual se obteve o pico de positividade do anticorpo com baixa marcação inespecífica.

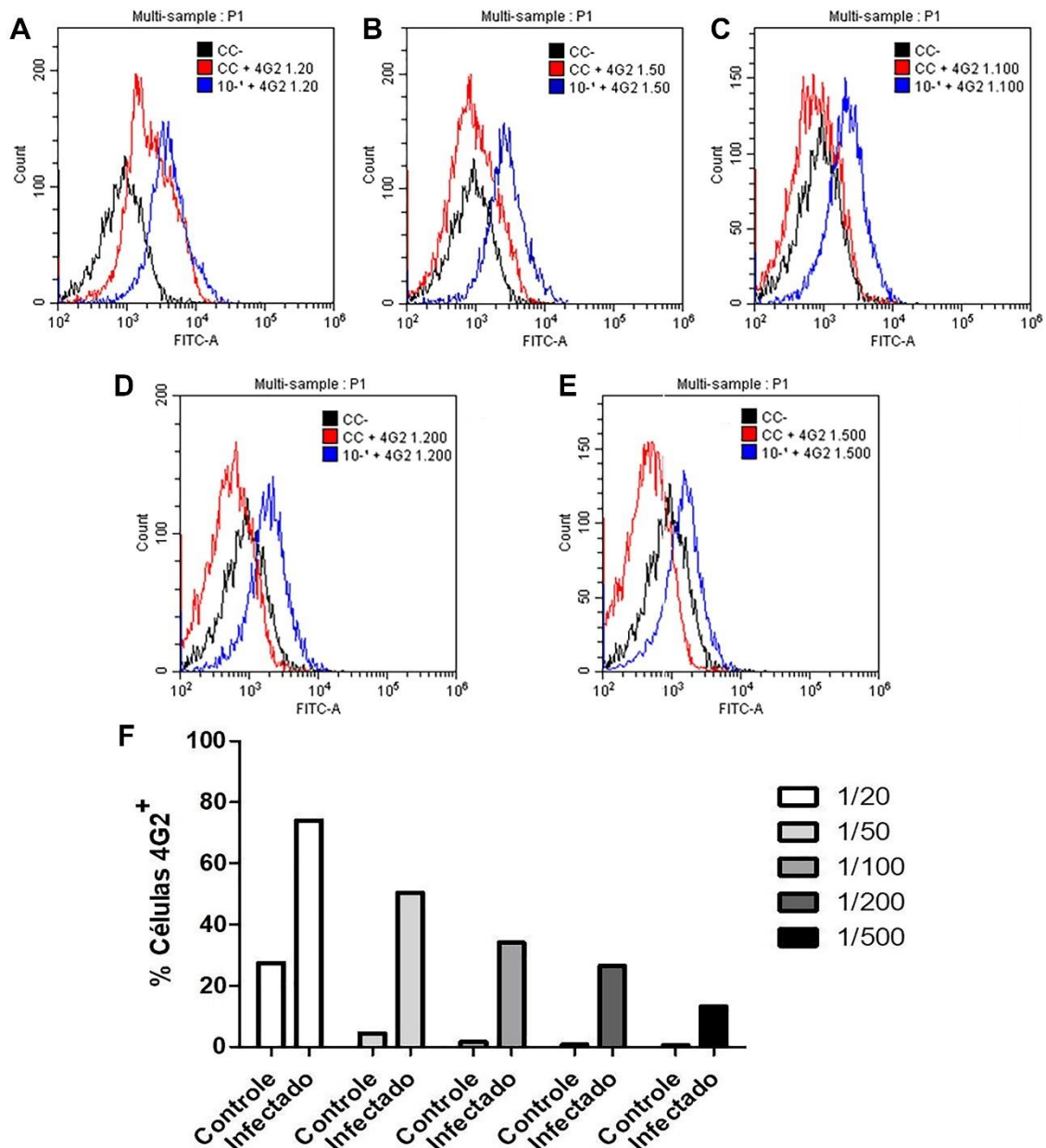
Figura 31 - Estratégia de *gate* utilizada na titulação do anticorpo 4G2.



Legenda: Figura representativa mostrando a estratégia de análise das células VERO sem infecção e com infecção com a vacina tetravalente da dengue. O primeiro gráfico *dot-plot* de parâmetros FSC x SSC, destaca a população celular específica para elaboração do *gate*. A partir desse *gate*, foi avaliada a porcentagem dos eventos positivos para o Ac 4G2 nas células infectadas e controle. Por fim, elaborou-se um gráfico com a sobreposição dos histogramas de cada diluição.

Fonte: (A autora, 2021).

Figura 32 - Titulação anticorpo 4G2 utilizando células VERO infectadas com a vacina tetravalente da dengue na diluição 10^{-1}



Legenda: Sobreposição dos histogramas para cada título do anticorpo 4G2. Controles sem marcação (preto) e com marcação (vermelho) com diferentes diluições do anticorpo 4G2: 1/20 (A), 1/50 (B), 1/100 (C), 1/200 (D) e 1/500 (E) e da condição infectada (azul), com diluição de 10^{-1} da vacina, marcados com 4G2 nas diferentes diluições de 1/20 (A), 1/50 (B), 1/100 (C), 1/200 (D) e 1/500 (E). Gráfico com a porcentagem das células positivas para 4G2 nas diferentes diluições de Ac (F).
Fonte: (A autora, 2021).

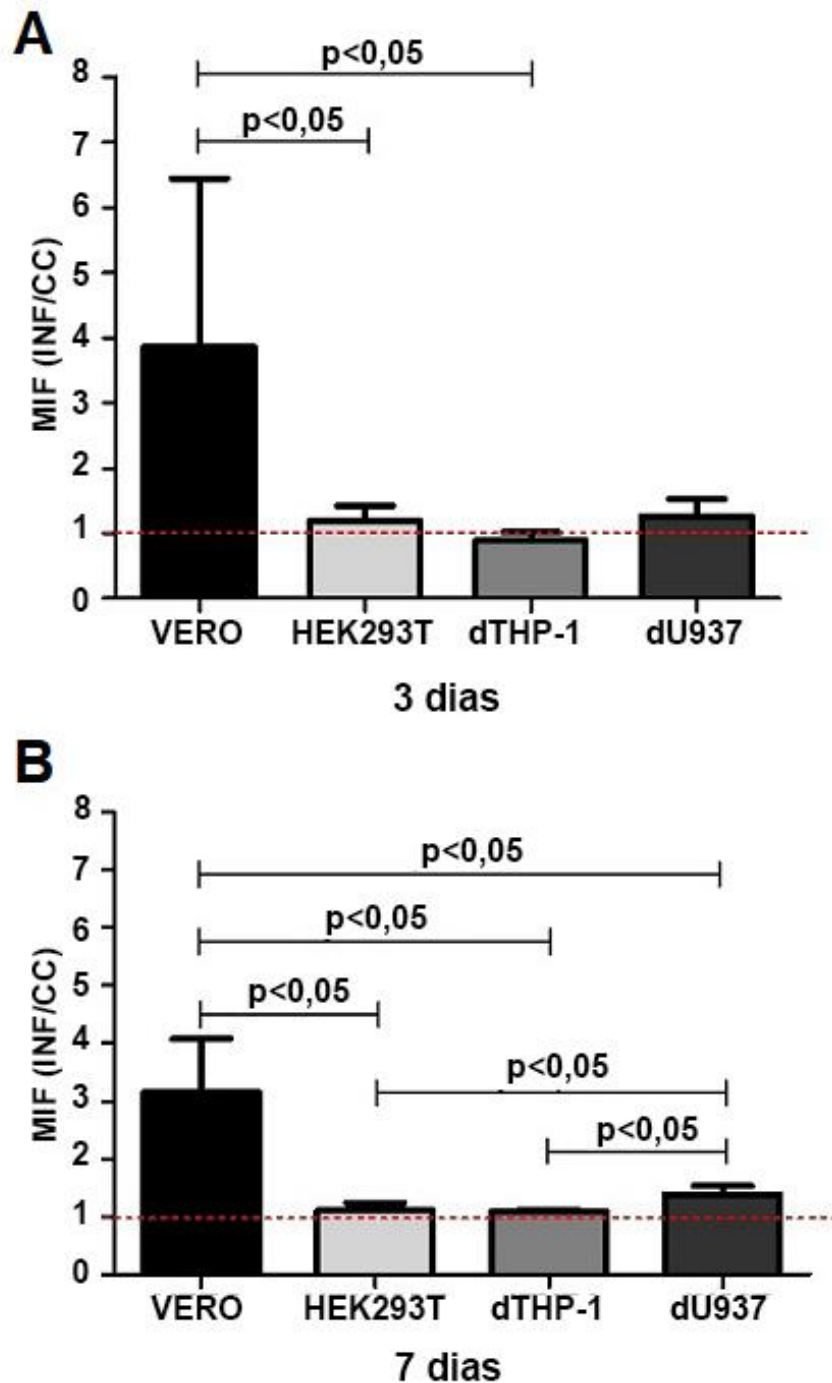
A próxima etapa foi avaliar a infectividade das células dTHP-1, dU937, HEK293T e VERO, com a marcação intracelular do vírus vacinal na diluição 10^{-1} , após três e sete dias de incubação por citometria de fluxo.

Após três dias de infecção com o vírus vacinal, foi calculada a razão entre a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células infectadas e a MIF do

controle celular, determinadas pela marcação com o anticorpo 4G2. Os valores médios obtidos foram de 3,86 para as células VERO, 1,20 para as células HEK293T, 0,89 para as células dTHP-1 e 1,27 para as células dU937 (Figura 33A). Quando comparados os valores médios, as células VERO apresentaram maior positividade para o 4G2 que as células HEK293T, dTHP-1 e dU937 após incubação com o vírus vacinal na diluição de 10^{-1} . Ainda, para o tempo de três dias, células dTHP-1 foram negativas para o anticorpo 4G2 (Figura 33A).

Já no tempo de sete dias de infecção com o vírus vacinal, o resultado da razão da MIF foi de 3,16 para as células VERO, 1,11 para as células HEK293T, 1,09 para as células dTHP-1 e 1,39 para as células dU937 (Figura 33B). Novamente, foi observado que as células VERO foram significativamente mais positivas que as demais células, com um aumento significativo da razão quando comparadas às células HEK293T, dTHP-1 e de dU937 ($p < 0,05$). Além disso, o resultado das células dU937 mostrou-se significativamente maior que os resultados das células HEK293T e dTHP-1 ($p < 0,05$). Para o tempo de sete dias, no entanto, as células dTHP-1 apresentaram positividade para o anticorpo 4G2 (Figura 33B).

Figura 33 - Razão das medianas de intensidade de fluorescência das células VERO, dTHP-1, dU937 e HEK293T nos tempos de três e sete dias de infecção viral



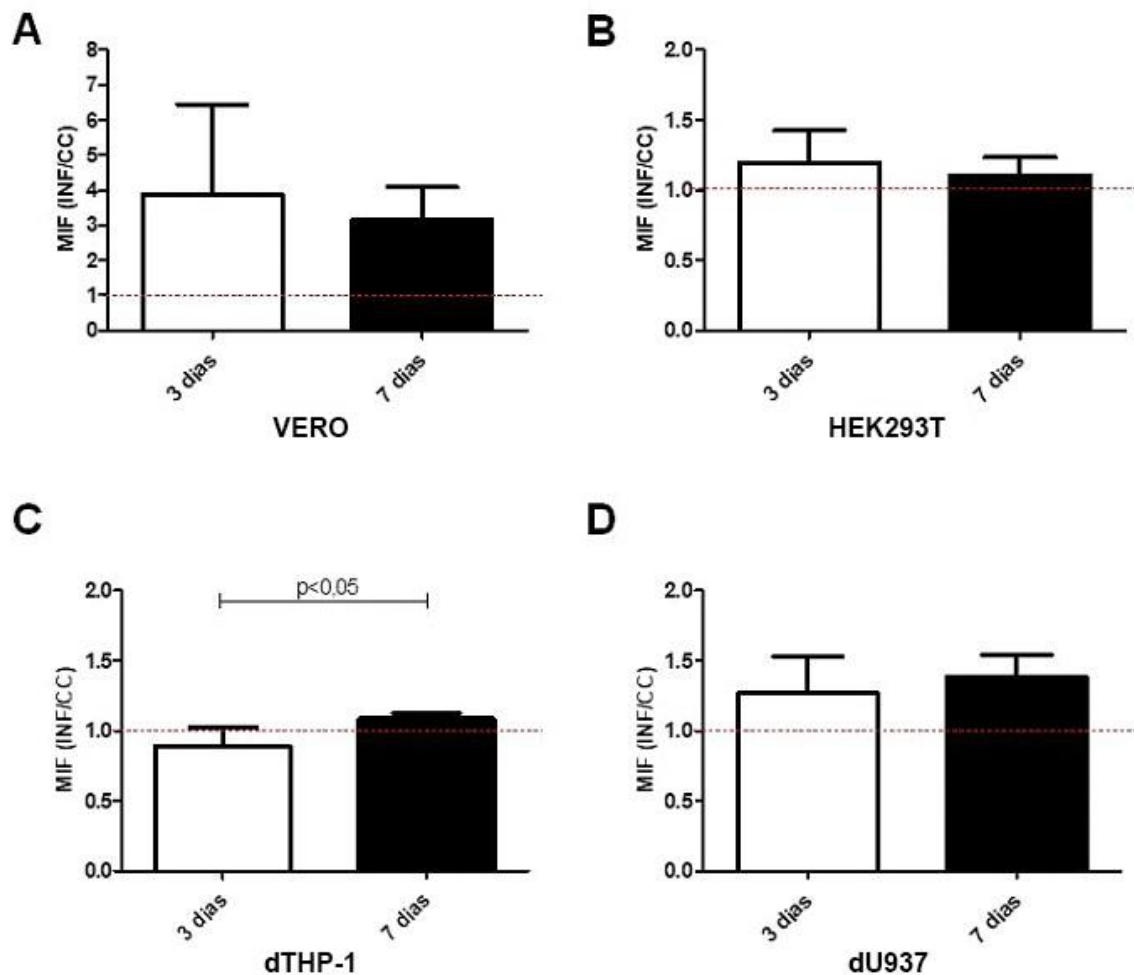
Legenda: Média das razões das MIF das células infectadas com o vírus vacinal sobre as MIF do controle marcado com o AC 4G2 após 3 dias (A) e 7 dias (B) de infecção viral. Linha pontilhada em vermelho indicando limiar para positividade. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com $p < 0,05$. $n=3$.

Fonte: (A autora, 2021).

Por fim, para avaliar o efeito do tempo sobre a infectividade do vírus vacinal, foram comparados os resultados obtidos após três e sete dias de incubação. Evidenciamos, portanto, o já observado que nas células dTHP-1 houve um aumento

significativo da razão no tempo de sete dias em comparação com o de três dias, onde este resultado foi negativo (Figura 34C). Enquanto que nas células VERO, HEK293T e dU937, não foi observada diferença significativa entre os tempos de três e sete dias (Figura 34A, Figura 34B e Figura 34D). Em relação às células VERO, foi possível observar uma estabilização dos valores de positividade no tempo de sete dias, com menor desvio padrão, comparado ao de três dias, sem, entretanto, alterar a mediana de MIF (Figura 34A).

Figura 34 - Comparação dos tempos três e sete dias de infecção nas células VERO, HEK293T, dTHP-1 e dU937



Legenda: Média das razões das MIF das células infectadas com o vírus vacinal sobre as MIF do controle marcado com o AC 4G2 após 3 dias e 7 dias de infecção viral. Células VERO (A), células dTHP-1 (B), células HEK293T (C) e células dU937 (D). Linha pontilhada em vermelho indicando limiar para positividade. Resultados de p-valor obtidos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os tempos ($p < 0,05$). $n=3$.

Fonte: (A autora, 2021).

5.6.2 Determinação da infectividade por microscopia confocal

A confirmação da infectividade viral foi realizada através do ensaio de imunofluorescência por microscopia confocal. As análises da infectividade com o vírus vacinal, na diluição 10^{-1} , das células VERO, dTHP-1, dU937 e HEK293T foram realizadas após sete dias de incubação, utilizando o anticorpo 4G2. As células VERO funcionaram como controle positivo.

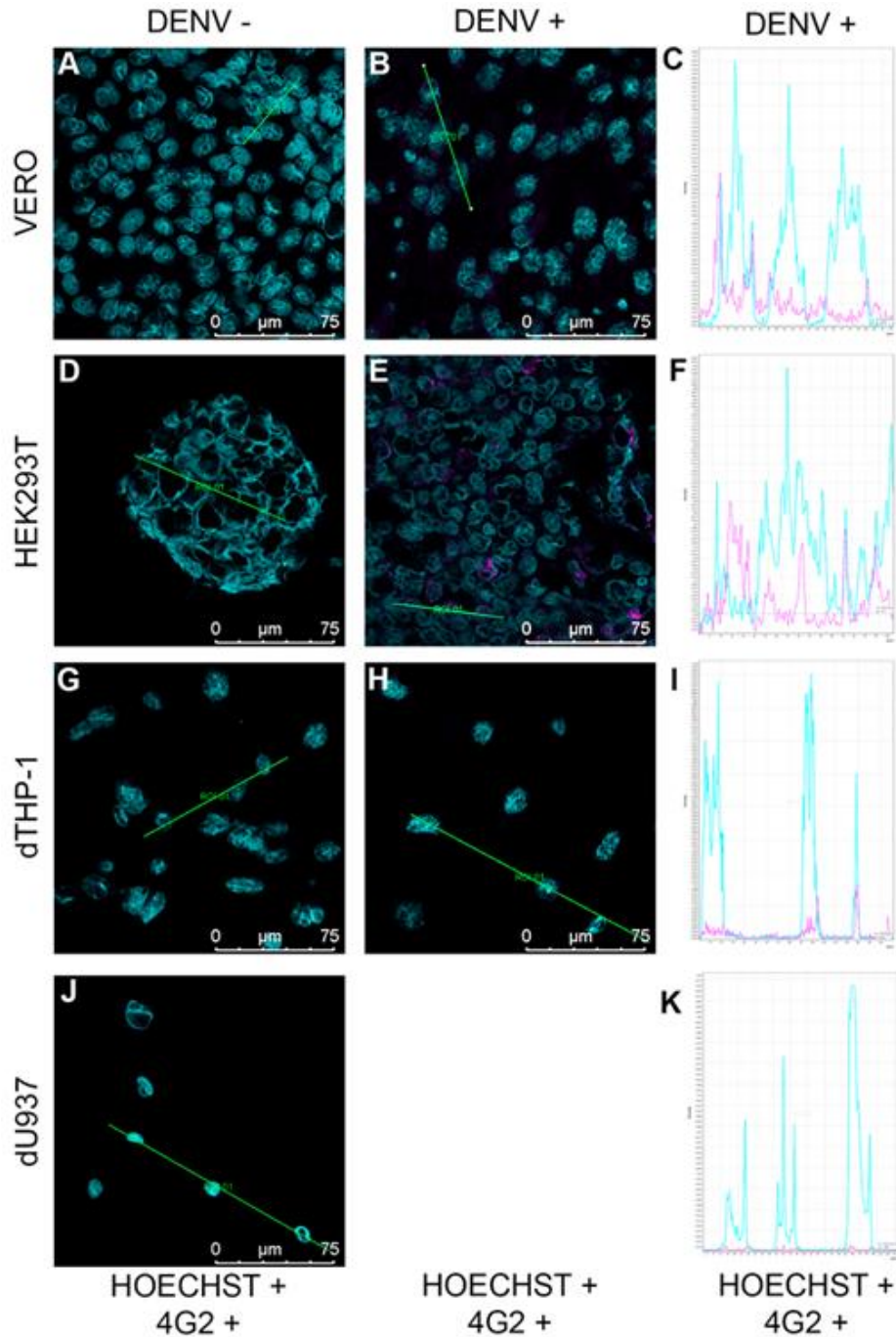
Após sete dias de incubação, observamos a infectividade viral positiva para linhagem celular VERO tanto pela visualização da cor violeta (anticorpo pan-Flavivirus 4G2) nas células, quanto pelo gráfico de intensidade de fluorescência traçado a partir da seleção de células de interesse (Figura 35B e Figura 35C). O gráfico mostra a célula infectada com a marcação do anticorpo 4G2 na cor violeta e a marcação do núcleo em azul (Hoescht).

Em relação à linhagem de células HEK293T, uma clara coloração do anticorpo 4G2 foi detectada no citoplasma dessas células, o que determinou sua suscetibilidade à infecção pela vacina tetravalente da dengue, em nossas condições experimentais (Figura 35E). Diferente das células VERO, a marcação de 4G2 nas células HEK293T se concentrou em uma região perinuclear (Figura 35F).

Nas células dTHP-1 e dU937, no entanto, não detectamos qualquer coloração do anticorpo 4G2 e também nenhum sinal foi visto, uma vez que traçamos o gráfico de intensidade de fluorescência (Figura 35H, Figura 35I e Figura 35K), confirmando os resultados encontrados no ensaio de imunocolorimetria. Como controles negativos, todas as células utilizadas também foram coradas com o anticorpo 4G2 na ausência da vacina tetravalente da dengue (Figura 35A, Figura 35D, Figura 35G e Figura 35J).

Assim, os resultados aqui encontrados para linhagem celular HEK293T confirmam os obtidos na citometria de fluxo e na imunocolorimetria no tempo de sete dias, sugerindo ser uma boa candidata para os ensaios de infectividade viral. Além disso, os resultados de imunofluorescência corroboram com os achados da citometria de fluxo que viabilizam a utilização de marcação intracelular da proteína E viral para determinação da infectividade.

Figura 35 - Microscopia de imunofluorescência confocal de células VERO, HEK293T, dTHP-1 e dU937 infectadas ou não com vacina tetravalente da dengue, após sete dias de incubação



Legenda: As células foram coradas com anti-4G2 (anticorpo pan-flavivírus, fluorescência rosa) e Hoechst (coloração de DNA, fluorescência azul). Controle negativo (A), (D), (G) e (J), células infectadas com diluição da vacina 10-1 por 7 dias (B), (E) e (H) mostrando positividade para 4G2 em células VERO e HEK293T (B) e (E). Gráfico representativo da intensidade de fluorescência (eixo y) em relação à distância em micrômetro (eixo x) das células infectadas (C), (F), (I) e (K). Barra de escala = 75 μm. Ampliação de 200X.

Fonte: (A autora, 2021).

5.7 Comparação das potências da vacina tetravalente da dengue estimadas por citometria de fluxo e imunocolorimetria, em ensaio com células VERO

Com o objetivo de comparar as diferentes metodologias na determinação da potência da vacina tetravalente da dengue, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo com células VERO (controle) com a mesma curva de diluição utilizada no ensaio de imunocolorimetria (padronizado pelo produtor).

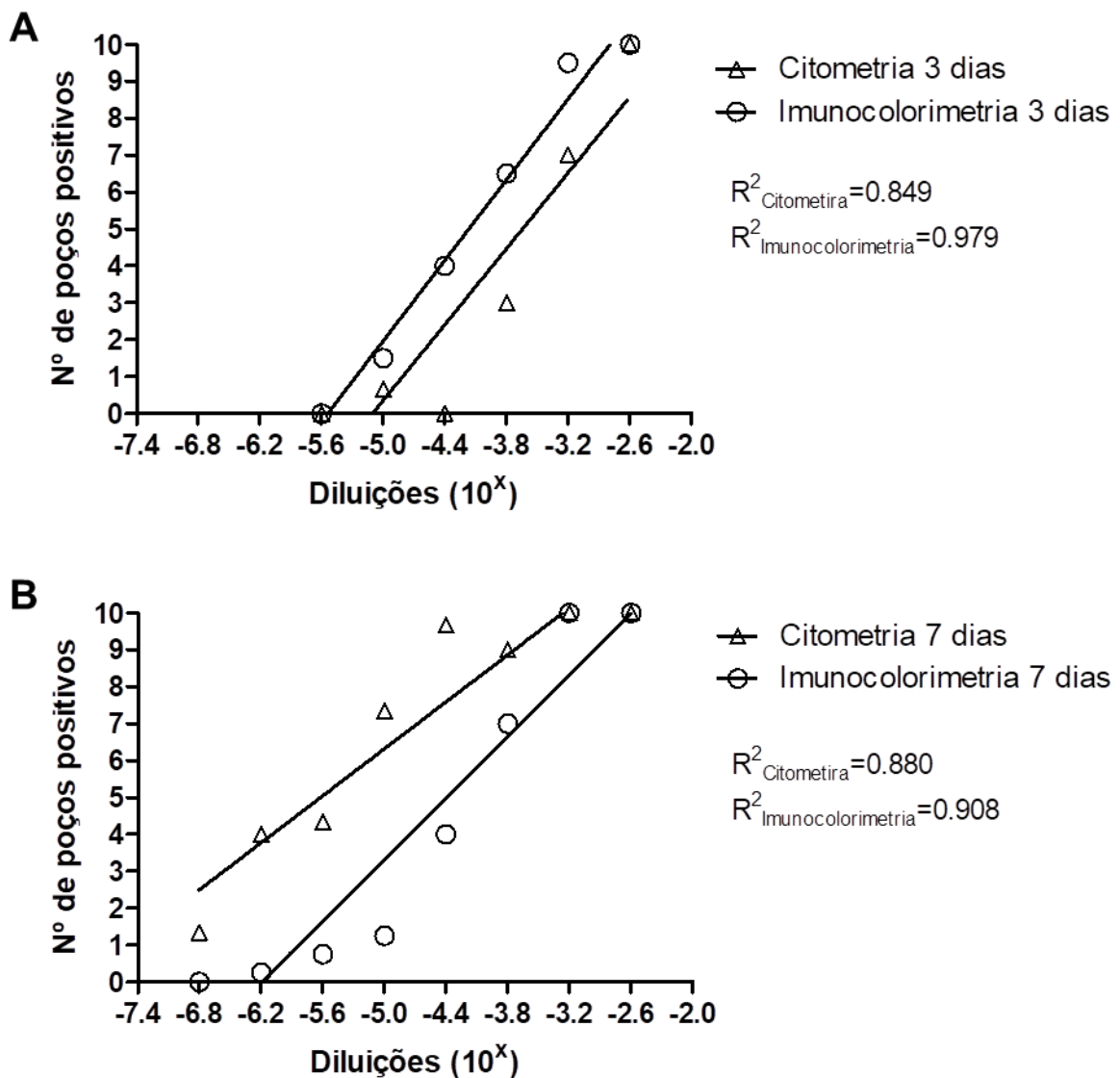
Para possibilitar a comparação das curvas de dose-resposta entre as diferentes metodologias, assim como o cálculo de potência, foi necessária a normalização dos dados obtidos na citometria de fluxo, uma vez que o resultado do ensaio por imunocolorimetria (número de poços positivos) difere do resultado obtido pela citometria (% de células infectadas ou MIF). Para realizar essa normalização, foi considerada que a diluição vacinal $10^{-2,6}$ é capaz de infectar todos os poços da microplaca no ensaio de imunocolorimetria, sendo, portanto, a diluição com 100% de positividade. Partindo desse princípio, para o ensaio de citometria de fluxo, a % de células infectadas na diluição de $10^{-2,6}$ foi considerada como o controle. Desse modo, todos os dados obtidos pela citometria de fluxo foram divididos pelo resultado do controle (diluição $10^{-2,6}$) encontrado em cada ensaio independente e multiplicado por 10 (número de poços experimentais do ensaio de imunocolorimetria), possibilitando a realização dos cálculos para determinação da potência e produzindo uma única métrica entre as metodologias.

Como os ensaios de citometria de fluxo foram realizados com a marcação por um anticorpo pan-*Flavivirus* 4G2 e nos ensaios de imunocolorimetria foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo, antes de comparar os resultados entre as diferentes metodologias e determinar as potências para a vacina tetravalente da dengue, foi calculada a média de positividade de poços entre os 4 sorotipos virais no ensaio de imunocolorimetria.

Após a padronização dos resultados obtidos em células VERO nas diferentes metodologias, as curvas de dose-resposta e o coeficiente de determinação da equação de regressão de respostas infecciosas foram estabelecidos para os tempos de três e sete dias de incubação, conforme demonstrado na **Figura 36** (3 dias $R^2_{\text{citometria}}=0,849$ e $R^2_{\text{imunocolorimetria}}=0,979$, Figura 36A e 7 dias $R^2_{\text{citometria}}=0,880$ e $R^2_{\text{imunocolorimetria}}=0,908$, Figura 36B).

Os resultados de regressão foram maiores que 80% de probabilidade e entre as metodologias foi observada linearidade, demonstrando a viabilidade da citometria de fluxo para este ensaio.

Figura 36 - Curva dose-resposta mostrando resposta das células VERO utilizando as metodologias de citometria de fluxo e imunocolorimetria, após três e sete dias de infecção com a vacina tetravalente da dengue

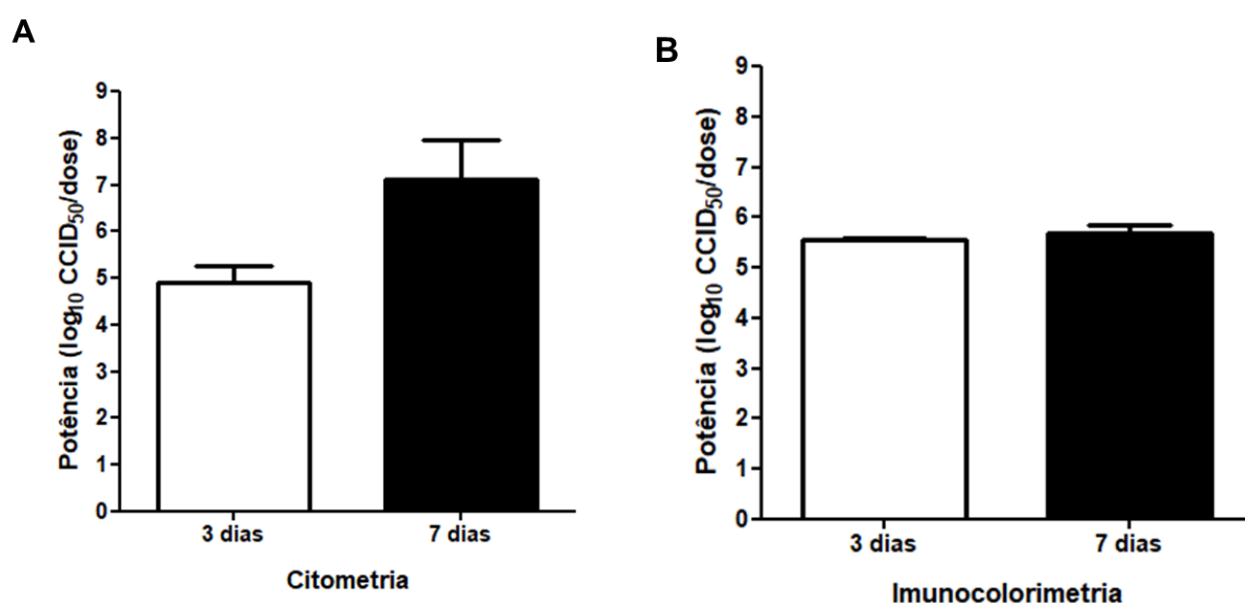


Legenda: Células VERO infectadas com a vacina tetravalente da dengue em diluições de $10^{-2.6}$ até $10^{-6.8}$, com fator de diluição 1: 4, analisadas por ensaio de citometria de fluxo (triângulo) e imunocolorimetria (círculo) após três (A) e sete dias (B) de incubação. n= 3.

Fonte: (A autora, 2021).

A próxima etapa foi comparar os resultados de potência no tempo de três e sete dias em cada uma das metodologias estudadas. Na citometria de fluxo não foram observadas diferenças significativas nos resultados de potência, contudo houve um aumento no valor de potência no tempo de sete dias em relação ao de três dias (Figura 37A). No ensaio por imunocolorimetria não houve diferença estatística entre os resultados de potência, após três e sete dias (Figura 37B).

Figura 37 - Potências médias, em \log_{10} CCID₅₀/dose, estimadas por citometria de fluxo e imunocolorimetria, no tempo de três e sete dias



Média das potências, em \log_{10} CCID₅₀/dose, em células VERO por citometria de fluxo após 3 dias (barra branca) e 7 dias (barra preta) (A). Imunocolorimetria após 3 dias (barra branca) e 7 dias (barra preta) (B). Resultado de p-valor obtido pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa entre as medianas calculadas. n=3.

Fonte: (A autora, 2021).

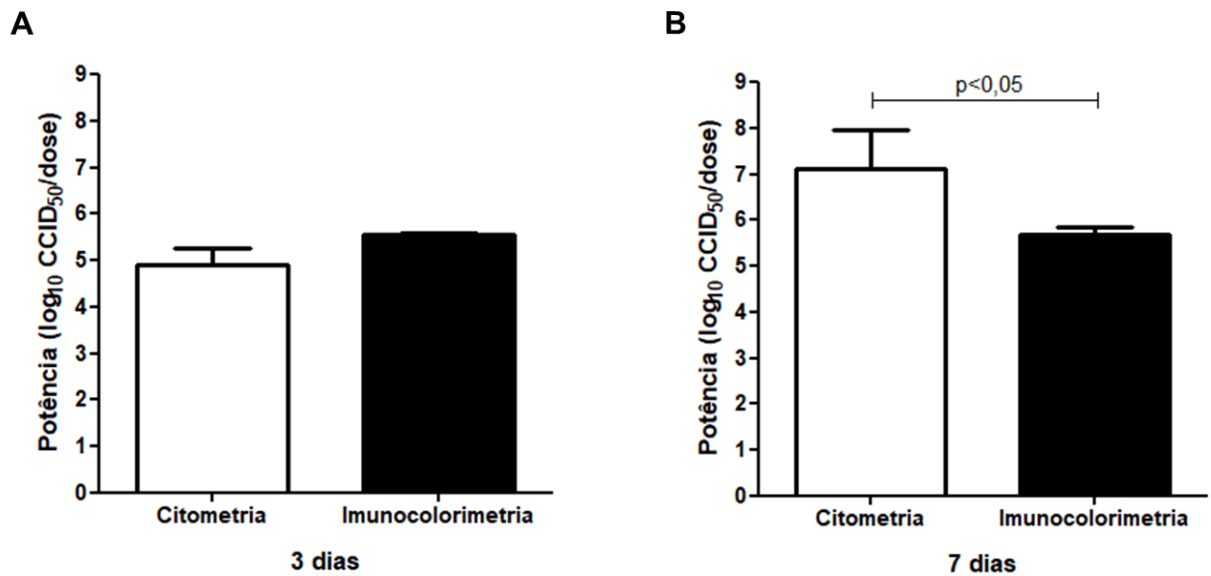
O próximo passo foi determinar as potências da vacina tetravalente da dengue em células VERO por citometria de fluxo e imunocolorimetria, comparando os resultados após três e sete dias de incubação.

Com três dias de infecção pelo vírus vacinal, as potências calculadas, em \log_{10} CCID₅₀/dose, utilizando as metodologias de citometria de fluxo e imunocolorimetria foram $4,89 \pm 0,38$ e $5,56 \pm 0,03$ respectivamente, conforme Figura 38A. Observamos que não houve diferença significativa entre os resultados das diferentes metodologias.

Já com sete dias, a estimativa da potência da vacina contra dengue, em \log_{10} CCID₅₀/dose, no ensaio de citometria de fluxo foi de $7,13 \pm 0,84$ enquanto que no

ensaio de imunocolorimetria foi de $5,67 \pm 0,18$, conforme Figura 38B. Quando comparadas as medianas, foi observada uma diferença significativa entre os resultados das duas metodologias ($p < 0,05$).

Figura 38 - Estimativa das potências médias, em \log_{10} CCID₅₀/dose, em células VERO por citometria de fluxo e imunocolorimetria, após três e sete dias de incubação com o vírus vacinal



Legenda: Média das potências, em \log_{10} CCID₅₀/dose, por citometria de fluxo (barra branca) e imunocolorimetria (barra preta) utilizando células VERO, após 3 dias (A) e 7 dias (B) de infecção com o vírus vacinal. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valor de significância de $p < 0,05$. $n=3$.

Fonte: (A autora, 2021).

6 DISCUSSÃO

A dengue é uma arbovirose que afeta o ser humano e causa sérios problemas de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor (URDANETA-MARQUEZ; FAILLOUX, 2011; DICK, *et al.*, 2012). O DENV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* e possui quatro diferentes sorotipos (DENV1 - 4) (SALLES *et al.*, 2018). Pela dificuldade no controle vetorial nos mais diversos países onde é endêmico, a principal estratégia que tem sido adotada atualmente para se obter uma medida profilática eficaz contra a doença é o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue.

No Brasil, o INCQS é o órgão responsável por garantir a qualidade e a liberação de cada lote de vacina consumido no país, avaliando critérios de qualidade como potência, identidade, termoestabilidade e outros (BRASIL, 2008). Segundo a OMS, a potência de vacinas tetravalente contra a dengue pode ser determinada em células VERO ou outra sensível ao vírus vacinal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Células VERO são amplamente utilizadas no desenvolvimento e controle de vacinas por seu baixo custo, facilidade de manipulação e principalmente por sua alta susceptibilidade a infecções pela maioria dos vírus (OSADA *et al.*, 2014). Essa alta permissibilidade parece estar associada à ausência na resposta antiviral por interferons do tipo 1, devido a deleção cromossômica dos genes responsáveis pela expressão dessas citocinas. (DESMYTER; MELNICK; RAWLS, 1968; DIAZ *et al.*, 1988; OSADA *et al.*, 2014). O IFN do tipo I desempenha um importante papel na resposta imune às infecções virais com o estabelecimento de um estado celular “antiviral”, que leva, em última instância, à inibição da replicação viral em células infectadas e resistência à infecção por células adjacentes (MURIRA; LAMARRE, 2016). No contexto da dengue, células VERO são utilizadas na produção de vacinas tetravalentes de vírus atenuados em decorrência da alta susceptibilidade ao DENV (PRECIOSO *et al.*, 2015; DENG *et al.*, 2020). Contudo, apesar do seu amplo uso, a alta sensibilidade ao DENV pode resultar em respostas diferentes das observadas em células humanas. Dessa forma, o presente trabalho se baseou na busca de uma ou mais linhagens celulares alternativas, que ainda possuíssem uma sensibilidade às vacinas virais atenuadas comercializadas, mas que fossem por um lado

principalmente linhagens de origem humana e por outro ainda possuísem características imunológicas mais próximas às células alvo do vírus vacinal.

Os estudos de transmissão, infecção, replicação e mecanismo de patogenicidade do DENV, bem como o desenvolvimento de vacinas ou terapias antivirais foram e ainda são dificultados pela falta de modelos *in vivo*, que mimetizem a doença, principalmente na manifestação grave da Dengue (BENTE; RICO-HESSE, 2006). No caso específico de vacinas, essa dificuldade ocorre no desenrolar de ensaios pré-clínicos de vacinas, onde após a imunização dos animais, tais como camundongos e macacos, os mesmos devem ser desafiados com o patógeno. Os ensaios *in-vitro* com as mais diferentes células, tanto primárias quanto linhagens celulares foram utilizadas para replicação e propagação viral, ensaios diagnósticos e estudo de mecanismos celulares envolvidos na resposta do hospedeiro ao vírus, onde tornaram importantes ferramentas na compreensão da relação vírus e hospedeiro (KITAB; KOHARA; TSUKIYAMA-KOHARA, 2018). De fato, o tropismo celular do DENV para DCs, monócitos, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais demonstrado *in vivo* sugeriu um papel importante da resposta inata nessa infecção viral e fez com que a comunidade científica envolvida com dengue seguisse nas pesquisas *in vitro*. Destarte, diferentes linhagens celulares mostraram ser suscetíveis a replicação viral. No entanto, ainda não está bem compreendido como o DENV e cada sorotipo se comporta em cada modelo celular (BENTE; RICO-HESSE, 2006; YOHAN *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que cepas isoladas do DENV variam em sua capacidade de infectar o mesmo tipo de célula *in vitro*, dependendo do genótipo do vírus e número de passagem. Por serem tratados como os primeiros e importantes alvos da replicação do DENV, monócitos e macrófagos, assim como linhagens celulares monocíticas ou diferenciadas, têm sido amplamente utilizadas para a realização de estudos de infecção do DENV (BENTE; RICO-HESSE, 2006; KITAB; KOHARA; TSUKIYAMA-KOHARA, 2018). Quando no presente estudo nos propusemos avaliar a suscetibilidade do vírus vacinal às linhagens celulares conhecidas como células alvo na infecção pelo vírus selvagem, visamos também contribuir com um melhor entendimento da atuação do vírus vacinal nessas células e contribuir dessa forma com o avanço nas pesquisas para opções ainda mais seguras e eficazes de possíveis candidatos para a prevenção da doença. Em relação aos estudos com linhagens celulares envolvendo o vírus vacinal da dengue não encontramos nenhum relato envolvendo as células aqui estudadas.

As linhagens celulares THP-1 e U937 têm sido amplamente utilizadas para estudar os mecanismos de infecção de DENV (JIANG; SUN, 2020; BAEK *et al.*, 2009; JIN *et al.* 2009). Já as células HEK293T têm sido utilizadas na pesquisa, produção e controle de vacinas virais, principalmente vacinas de vetor viral (vacina contra COVID-19) e de ácidos nucleicos (vacina contra Influenza- H1N1) (ALMUQRIN *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2020; MILIÁN *et al.*, 2017). No contexto da dengue, células HEK293T mostraram-se susceptíveis à infecção pelo DENV e outros membros da família *Flaviviridae* (JITOBOAM *et al.*, 2016).

Diante disso, a proposta do trabalho foi avaliar a sensibilidade dessas três diferentes linhagens celulares humanas (HEK293T, THP-1 e U937) à infecção pelo vírus vacinal no ensaio de potência da vacina tetravalente da dengue, como alternativa metodológica às células VERO, em decorrência de diferenças biológicas importantes entre as células animais (VERO) e células humanas frente à infecção pelo DENV. Além disso, objetivou-se o desenvolvimento de uma metodologia alternativa para avaliação da potência.

Inicialmente, padronizamos o protocolo de indução de diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 a macrófagos a partir da sua estimulação com PMA, a fim de obter células-alvo do DENV e imunocompetentes. Tendo em vista a ausência de um consenso na determinação de protocolos para diferenciação, foram estabelecidas três concentrações, selecionadas com base nos trabalhos de Zhou e colaboradores (2010) que utilizaram a concentração de 20 ng/mL de PMA por 48 horas e Park e colaboradores (2007) que propuseram as concentrações de 10 ng/mL e 50 ng/mL de PMA durante 48 horas.

Quando analisadas morfológicamente, as células THP-1 e U937 tratadas apresentaram um claro aumento no tamanho e uma nítida aderência à placa. Além disso, observamos também uma morfologia condizente com o fenótipo celular, de células mais achatadas, de citoplasma abundante e irregular, rico em grânulos e presença de prolongamentos citoplasmáticos. Estas características já foram descritas por diversos autores (ZHOU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2007). Essa morfologia dos macrófagos está associada à redução da razão entre núcleo e citoplasma, devido a um aumento no volume citoplasmático, e ao acréscimo na granulosidade dessas células, com o aumento do número de organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e lisossomo (DAIGNEAULT *et al.*, 2010). De fato, quando analisadas a área das células THP-1 e U937 tratadas e não tratadas com PMA, foi observado um aumento

significativo das células tratadas, demonstrando um perfil fenotípico diferenciado (macrófagos). Os resultados foram principalmente relevantes na concentração de estímulo de 20ng/mL de PMA, conforme descrito no capítulo 5 (resultados) do presente trabalho. Esses dados corroboram os de Daigneault e colaboradores (2010), que demonstraram que o tratamento com PMA aumenta a aderência e o volume citoplasmático nas células em relação aos monócitos não tratados.

Células mononucleares fagocíticas (fagócitos) são caracterizadas por alta atividade fagocítica e síntese de compostos antimicrobianos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), necessárias para uma resposta inflamatória efetora (MILLS *et al.*, 2000; SERBINA *et al.*, 2008). Dentro desse grupo populacional, monócitos ativados e principalmente macrófagos M1 são importantes componentes na produção de NO e outros componentes pró-inflamatórios (MILLS *et al.*, 2000; ITALIANI; BORASCHI, 2014). Com as alterações morfológicas já confirmadas, a produção de NO foi determinada a fim de ratificar a diferenciação dessas células bem como escolher a concentração de estímulo necessária para induzir a diferenciação celular viável. Assim, determinamos a ativação das linhagens para um fenótipo semelhante a macrófagos através da capacidade dessas células, após estímulo com PMA, de produzirem NO.

Os resultados obtidos indicaram que na concentração de 20ng/mL de PMA as células THP-1 e U937 apresentaram aumento maior na quantidade de NO detectável (medido), quando comparado ao resultado obtido com outras concentrações do PMA, com diferença significativa para o controle. Esse achado indicou que o estímulo por PMA direcionaria o fenótipo celular dessas linhagens monocíticas para um perfil pró-inflamatório (reativo), normalmente desencadeado por fagócitos, em especial células M1, visto que, de uma forma geral, essas células desempenham um importante papel na resposta inflamatória, tendo a produção de NO como um importante mediador pró-inflamatório, de função ampla no sistema imunológico, e cuja síntese é regulada pela disponibilidade de L-arginina, que serve como substrato para a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NICHOLSON *et al.*, 2001; XUE *et al.*, 2018).

A imunofenotipagem tem como objetivo analisar e definir os diferentes subtipos celulares, caracterizando, quantificando e categorizando as diversas populações celulares presentes no organismo e suas amostras, para interesse clínico, laboratorial e científico, analisando os diferentes antígenos, ou marcadores, presentes em cada população celular estudada.

A categorização de células imunológicas constitui um desafio em decorrência da grande plasticidade celular desse conjunto de células e na vasta variedade de subpopulações celulares (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010; ITALIANI; BORASCHI, 2014). Assim, um conjunto de marcadores tem sido definido para melhor estratificar essas populações heterogêneas (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). A molécula de CD11b, que compõe a subunidade α M da integrina α M β 2 (Mac-1, CD11b/CD18, CR3), constitui um marcador ubíquo das células leucocitárias ativadas, notadamente expressas em neutrófilos e monócitos ativados e, mais especificamente, em macrófagos, ligada, principalmente, à adesão e migração dessas populações celulares para os sítios de infecção e inflamação (SOLOVJOV; PLUSKOTA; PLOW, 2005; CUI *et al.*, 2018; HERMIDA, 2007).

Assim, para melhor avaliarmos a ativação e diferenciação das células monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos, bem como a citotoxicidade do indutor utilizado, PMA, no processo de diferenciação, foram realizados experimentos com o marcador de superfície CD11b e o intercalante de DNA, PI, para avaliar morte celular, por citometria de fluxo.

De fato, foi observado que células THP-1 e U937 tratadas com PMA apresentavam aumento na expressão do marcador (CD11b), condizente com o perfil de ativação e diferenciação em macrófagos. O aumento identificado nas células THP-1 foi mais proeminente nas concentrações de 20 ng/mL e 50 ng/mL de PMA, enquanto que nas células U937, nas quais esse aumento se deu de forma homogênea entre as diferentes concentrações do indutor. Esses achados corroboram com o trabalho de Spano, Barni e Sciola (2013), que avaliaram a expressão da integrina CD11b na diferenciação das células THP-1 em macrófagos após indução por diferentes concentrações de PMA (6 nM, 30 nM e 60 nM) e observaram um aumento de células positivas para CD11b concentração dependente. E, ainda, aos achados de Yamamoto e colaboradores (2009), que observaram que células U937 diferenciadas em macrófagos apresentavam um aumento na marcação de CD11b.

Dessa forma, os resultados do trabalho condizem com os achados que demonstram que o tratamento de células monocíticas THP-1 e U937 com PMA leva a um fenótipo mais maduro, com uma menor taxa de proliferação (quiescência celular), mudança morfológica e maiores níveis de aderência, maior taxa de fagocitose e modificação na expressão de marcadores celulares, como o aumento de CD11b (ALDO *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2009).

Quando avaliada a viabilidade celular, em decorrência da citotoxicidade do indutor de diferenciação, após o tratamento com PMA, nas concentrações 10 ng/mL, 20 ng/mL e 50 ng/mL, foi observado que nas células THP-1 o tratamento com 50 ng/mL de PMA foi o que apresentou maior toxicidade (redução da viabilidade celular) às células, enquanto que nas células U937 não houve variação na viabilidade celular entre os tratamentos. De fato, trabalhos demonstram que o aumento na concentração de PMA está relacionado com um aumento na incidência de apoptose celular (SPANIO; BARNI; SCIOLA, 2013; FINSTAD *et al.*, 1998).

Assim, diante dos resultados obtidos, foi observado que o protocolo de tratamento com 20 ng/mL de PMA foi o que demonstrou maior eficiência na diferenciação das linhagens monocíticas para um fenótipo semelhante a macrófagos, provavelmente M1, com alteração morfológica, aumento na produção de NO, modificação de marcadores celulares (CD11b) e boa taxa de viabilidade celular.

Células com o perfil M1 são importantes na resposta antiviral e muitos vírus são capazes de modular a diferenciação de macrófagos para diferentes perfis (SANG; MILLER; BLECHA, 2015). Na dengue, foi proposto que o vírus selvagem induz a ativação de inflamossomas, assim levando à polarização de macrófagos para um perfil M1 através do aumento de GM-CSF (WU; CHEN; HSIEH, 2013). No caso do vírus vacinal não há relatos sobre a atuação deste na polarização de macrófagos ou já em macrófagos polarizados. No entanto, levando em consideração que o vírus vacinal deverá ativar uma resposta imunológica e que a resposta imunológica inata, primeira a ser ativada tanto na infecção natural quanto na vacinação, ao nível de macrófagos, se iniciaria com a diferenciação deste em M1, conforme descrito em diversos trabalhos (WANG; LIANG; ZEN, 2014; PATEL *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2020), nos pareceu importante utilizar uma linhagem diferenciada em M1 para testar a suscetibilidade ao vírus vacinal e, então, prosseguir com a nossa proposta de avaliar a potência da vacina em uma célula mais próxima ao que acontece dada a vacinação. Sendo assim, o protocolo foi estabelecido como padrão para a realização dos experimentos de infecção com a vacina tetravalente da dengue.

A fim de avaliar a presença de infecção da vacina tetravalente da dengue, determinada a partir do ensaio definido pelo produtor (imunocolorimetria), em células HEK293T, dTHP-1 e dU937, foram realizados ensaios preliminares utilizando anticorpo monoclonal específico para o vírus da dengue sorotipo 2 (CYD-2), nas diluições da vacina 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$, nos tempos de um, três e sete dias. A célula

VERO foi utilizada como controle positivo e o ensaio de infecção por HEK293T, dTHP-1 e dU937 foram executados precisamente nas mesmas condições.

A escolha pelo sorotipo 2 deu-se em decorrência deste ter apresentado a menor eficácia vacinal em indivíduos imunizados com a vacina tetravalente para dengue durante os testes clínicos e populacionais realizados (HADINEGORO *et al.*, 2015). Dessa forma, ao ser analisado o “pior caso”, a hipótese de susceptibilidade das linhagens celulares humana à vacina estaria sendo submetida à pior condição, assim, caso o resultado se mostrasse positivo, esperava-se que os demais sorotipos também apresentassem positividade.

Contudo, não foi possível determinar a sensibilidade celular à infecção pela vacina tetravalente CYD-TDV no tempo e nas concentrações estudadas para as células dTHP-1 e dU937. Além da capacidade analítica do ensaio, a ausência de infecção pode estar relacionada à atenuação viral, o que leva a uma perda na virulência dos vírus vacinais, somada à maior resistência dessas células a infecções pelo DENV (JIN *et al.*, 2009; DIAMOND *et al.*, 2000). Além disso, a diferenciação e estímulo dessas células para um perfil semelhante a macrófagos 1 (M1) resultaria em células com maior imunocompetência, com o aumento nas atividades fagocíticas, vias de sinalização e resposta a antígenos (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014). No entanto, ainda seria interessante avaliar por um lado o sobrenadante das culturas quanto às citocinas produzidas, bem como comparar a resposta dessas células em tempos menores de incubação, 24 horas ou menos, utilizando técnicas de detecção mais sensíveis do que a imunocolorimetria, citometria, por exemplo, e comparar com o vírus selvagem. Mesmo descartando essas células para um ensaio de potência, uma investigação sobre exatamente essa resistência poderia contribuir com uma compreensão melhor da resposta inata envolvendo a vacina. Vale ressaltar que não foi possível avaliar o comportamento dessas células em relação aos outros sorotipos vacinais, o que seria também um ponto a ser testado.

Em relação às células HEK293T, os resultados demonstraram que essas células são sensíveis à infecção pela vacina tetravalente contra dengue (Dengvaxia®) nos tempos de três e sete dias de incubação com as diluições testadas, sendo uma candidata viável para testes de determinação da potência e identidade de vacinas tetravalentes da dengue. Para o tempo de um dia não foi observada a presença de infecção nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$, inclusive para as células VERO, apontando que o tempo de um dia seria insuficiente para o estabelecimento de

infecção viral detectável pelo método analítico utilizado, ensaio de imunocolorimetria nessas duas linhagens.

Conforme definição, a determinação da potência de vacinas consiste em avaliar a resposta do produto vacinal frente a um dado substrato biológico, a fim de estimar o potencial da vacina em gerar o efeito final desejado (METZ *et al.*, 2002). Para vacinas atenuadas a potência é geralmente expressa em termos de unidades infecciosas contidas em uma dose, conforme estabelecido nos estudos clínicos conduzidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Segundo a OMS, para vacinas tetravalentes contra a dengue a potência deve ser avaliada em termos de títulos individuais de cada um dos quatro sorotipos em ensaios de titulação viral por plaque, CCID₅₀ ou imunofocus em cultura de células VERO ou outras células sensíveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

Nesse contexto, a linhagem celular HEK293T mostrou-se sensível à infecção pelos quatro sorotipos presentes na vacina Dengvaxia®, mesmo que, conforme o esperado, com menor permissibilidade que a linhagem celular VERO. De fato, nossos resultados apontam para a viabilidade de um modelo utilizando células HEK293T, tendo sido possível determinar a infecção da vacina em diferentes concentrações através de imunoensaio preconizado pelo produtor da vacina, com um comportamento dose-dependente próximo ao das células VERO, recomendadas como modelo celular padrão. Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a infectividade de uma vacina tetravalente contra a dengue nessa linhagem celular.

Diante desse comportamento, foi avaliada, então, a viabilidade de estimar a potência utilizando esse modelo celular. Na comparação da potência geral da vacina entre as células VERO e HEK293T nos tempos de três e sete dias, observamos uma diferença significativa entre os resultados das duas células. Segundo os critérios do produtor, a potência vacinal deve estar em torno de 4,5-6,0 log₁₀ CCID₅₀/dose, dessa forma, apenas as células VERO atingiram os critérios. Apesar disso, o resultado encontrado não foi inesperado, visto que uma mudança no substrato biológico (VERO), que serviu para o desenvolvimento e padronização da produção da vacina tetravalente da dengue analisada (GUY *et al.*, 2011), pode resultar numa mudança significativa nos critérios produtivos e valores obtidos, principalmente em decorrência da mudança na sensibilidade do substrato à infecção viral (KUMAR *et al.*, 2018).

Contudo, quando estratificados os valores de potência, para definição em relação a cada sorotipo, conforme recomendado pela OMS, os resultados obtidos

nesse modelo, diferentemente do modelo utilizando células VERO, demonstraram valores de potência bem distintos entre os sorotipos virais presentes na vacina, com o prevailecimento do sorotipo 4 em relação aos demais, principalmente os sorotipos 1 e 3. Esses resultados se assemelham ao comportamento da vacina nos estudos de imunogenicidade conduzidos, que apontaram para uma dominância do sorotipo 4 em relação aos demais (HENEIN *et al.*, 2017; GUY, 2009).

Esses achados apontam para a necessidade no aprofundamento da investigação do uso dessa linhagem celular em modelos preditivos para avaliar o comportamento de vacinas tetravalente contra a dengue, diante da possível capacidade do modelo em evidenciar diferenças entre as respostas de cada sorotipo vacinal.

Dessa forma, devido à importância em desenvolver vacinas contra a dengue capazes de gerar uma resposta imunológica balanceada e eficaz contra os quatro sorotipos virais, nosso trabalho aponta para a linhagem celular HEK293T como uma promissora candidata no desenvolvimento de metodologias capazes de determinar a potência e identidade de vacinas tetravalentes contra a dengue, de vírus atenuados, e capazes de observar, *in vitro*, diferenças entre as potências para cada sorotipo ao longo das fases de desenvolvimento e controle da produção dessas vacinas.

O próximo passo e proposta desse trabalho foi a procura de um ensaio alternativo de maior sensibilidade quando comparado com a imunocolorimetria. Isto poderia ser muito importante quando consideramos linhagens celulares menos permissíveis ao vírus vacinal e por isso seu efeito sobre estas menos visíveis em um ensaio colorimétrico. Por outro lado, o ensaio deveria ser também possível com as células padrão VERO, assim controlando uma possível potência superestimada da vacina.

A citometria de fluxo tem sido utilizada em diversas questões técnico-científicas, entre estas para estudar a interação célula-vírus e detectar, rapidamente, células infectadas por partículas virais (KAO *et al.*, 2001). Além disso, a técnica tem sido utilizada para a avaliação da potência de vacinas virais, sendo possível determinar o título da infecção viral. De fato, essa técnica tem se mostrado como um modelo mais rápido para estimar a potência dessas vacinas, com tempos médios inferiores aos ensaios convencionais (LAMBETH *et al.*, 2005). Dessa forma, a próxima etapa do trabalho foi avaliar a infectividade das células VERO, dTHP-1, dU937 e HEK293T por citometria de fluxo, após três e sete dias de incubação com o vírus

vacinal, para avaliação da viabilidade da técnica no estudo de potência de vacinas tetravalentes contra a dengue.

Nossos resultados em células VERO demonstraram ser possível evidenciar a infecção, nos tempos estudados, pelo vírus vacinal utilizando a técnica de citometria de fluxo, com uma evidente detecção da presença de partículas virais na amostra celular. Além disso, os resultados obtidos com a técnica de citometria de fluxo assemelham-se aos encontrados nos ensaios com a metodologia do produtor, que evidenciam uma maior susceptibilidade da linhagem VERO com relação às demais.

Novamente, esses resultados corroboram com o descrito na literatura que demonstra que células VERO são altamente suscetíveis à infecção pelo vírus da dengue e configuram como primeira escolha em ensaios biológicos para avaliação de critérios de qualidade vacinal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Dessa forma, foi possível inferir a viabilidade da metodologia de citometria de fluxo na análise da infecção vacinal de vacinas contra a dengue. De fato, Von Sydow e colaboradores (2000), em estudo utilizando cepas selvagens de DENV, quantificaram, por citometria de fluxo, a taxa de infecção do DENV-1 (cepa 16001) e DENV-2 (cepa 16681) em células C6/36 e células VERO e observaram correlação entre a concentração viral e o número de células infectadas com vírus (VON SYDOW *et al.*, 2000).

Quanto ao comportamento das linhagens humanas, todas apresentaram níveis de infecção menores, e, ainda, foram observados dois fenômenos, com um comportamento da linhagem dTHP-1 distinto das demais (dU937 e HEK293T). Em relação à linhagem dTHP-1, ao avaliar as razões da MIF, as células mostraram-se mais resistentes à infecção pelo vírus vacinal quando comparadas às demais células utilizadas, tanto para três quanto para sete dias de exposição. Esses resultados demonstram o já relatado em outros estudos que observaram uma menor susceptibilidade da linhagem à infecção pelo vírus da dengue (DIAMOND *et al.*, 2000; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003).

Quando avaliadas as respostas celulares, pela razão da MIF, nos tempos de três e sete dias, foi observado um aumento na infecção dessas células quando expostas por sete dias à vacina contra a dengue, com uma reversão do perfil de resistência inicial (três dias) à infecção. Esse fenômeno, de reversão ou atenuação da resistência celular, pode estar ligado às moléculas presentes no vírus da dengue e em outros flavivírus, que promovem mecanismos de virulência, como escape de resposta imunológica e celular. Em estudo conduzido por Laurent-Rolle e colaboradores (2014),

foi observado que a proteína NS5 da cepa vacinal YFV-17D é capaz de reduzir a resposta celular antiviral através da inibição da proteína STAT2, num mecanismo dependente da sinalização por IFN do tipo I. Além disso, outros trabalhos demonstraram que a proteína STAT2 é alvo de inibição pela proteína NS5 de outros membros do gênero *Flavivirus*, como o DENV (ASHOUR *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2005). Nesse contexto, frente a uma resposta celular inicial à infecção pelo vírus vacinal quimérico, constituído pelas proteínas não estruturais (NS) da cepa YFV-17D, pode ter ocorrido uma seleção da via de escape/ inibição da resposta antiviral em decorrência da alta de sinalização por IFN-I.

Já quanto às células dU937 e HEK293T, ficou evidenciado a suscetibilidade dessas células ao vírus da dengue, ao longo dos tempos de três e sete dias de exposição, com um aumento na razão da MIF, embora discreto quando comparado ao observado nas células VERO. Nossos resultados corroboram com o trabalho de Diamond e colaboradores (2000) que observaram, por citometria de fluxo, a infecção de células U937, diferenciadas em macrófagos, pelo DENV-2 e com os achados de Jitoboam e colaboradores (2016) que demonstraram a infecção de células HEK293T pelo DENV-2 e DENV-4. Além disso, em trabalho recente de Yakass, Franco e Quaye (2020) foi demonstrado que os IFN- α/β inibem a infecção por diferentes flavivírus e o IFN- α limita a replicação do DENV em macrófagos, o que pode justificar uma menor infecção dessas células quando comparadas às células VERO, o que aponta para necessidade de mensurar essa citocina em nosso modelo. Ainda, no mesmo trabalho foi observado que as células HEK293T foram suscetíveis ao vírus vacinal da febre amarela (YFV-17D).

Por fim, realizamos a confirmação da infectividade viral nas células VERO, HEK293T, dTHP-1 e U937 através do ensaio de imunofluorescência por microscopia confocal no tempo de sete dias. Foi observada a presença de partículas virais no citoplasma tanto nas células VERO quanto nas células HEK293T. Além disso, a distribuição dessas partículas concentrou-se majoritariamente em região perinuclear, uma característica comum às células infectadas com o DENV (CERVANTES-SALAZAR *et al.*, 2015.). Já as células dTHP-1 e dU937 não apresentaram marcação pelo anticorpo 4G2 no tempo de sete dias.

Esses achados corroboram com as outras metodologias utilizadas que demonstraram que essas duas linhagens (HEK293T e VERO) são sensíveis à infecção ao vírus vacinal. Além disso, trabalho de Jaratsittisin e colaboradores (2020)

demonstrou que as células HEK293T são suscetíveis a infecção pelo DENV e amplamente utilizadas em estudos de DENV.

Propusemos também, no presente trabalho, avaliar a possibilidade de desenvolver um ensaio de potência utilizando a metodologia de citometria de fluxo. Para isso, priorizamos a infecção e elaboração de um modelo com células VERO, em decorrência dos resultados de infectividade definida por citometria de fluxo, e pela linhagem configurar como primeira escolha para elaboração de ensaios biológicos para avaliar critérios de qualidade vacinal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Além disso, a escolha inicial por células VERO também ocorreu pela facilidade em comparar a metodologia a ser testada (citometria de fluxo) com a metodologia tradicional (do produtor).

Dessa forma, as células VERO foram infectadas com a vacina tetravalente da dengue seguindo as mesmas concentrações utilizadas no ensaio de imunocolorimetria. Observamos que, em semelhança com o ensaio de imunocolorimetria, foi possível determinar, com a técnica de citometria de fluxo, a infecção pelo vírus vacinal, com um comportamento dose-dependente, tanto para três quanto para sete dias de incubação com a vacina. Além disso, as curvas obtidas demonstraram linearidade entre os valores encontrados nas diferentes diluições experimentais e indicaram uma forte relação linear entre as variáveis, sendo possível delimitar uma curva dose-resposta para a vacina contra dengue em células VERO, a partir de ensaio de citometria de fluxo. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Lambeth e colaboradores (2005) que compararam o ensaio baseado em citometria de fluxo para titulação do DENV utilizando o anticorpo 4G2 para marcação intracelular com o ensaio de placa (método padrão), com diferentes diluições do vírus e observaram uma relação linear entre os ensaios, indicando que os dois ensaios foram semelhantes em determinar a infectividade do vírus em uma amostra. Em outro trabalho, visando determinar o pico de viremia em amostras obtidas de pacientes de FD, a citometria de fluxo foi empregada com sucesso como técnica quantitativa (PAES *et al.*, 2005).

Na comparação das potências da vacina tetravalente da dengue obtidas tanto na metodologia de citometria de fluxo quanto na de imunocolorimetria utilizando células VERO, os resultados obtidos, principalmente no tempo de três dias, foram semelhantes nas duas metodologias, sugerindo a viabilidade da utilização do ensaio de citometria de fluxo. Esses resultados corroboram com o trabalho já mencionado de

Lambeth e colaboradores (2005). Já no tempo de sete dias, houve um aumento significativo na potência estimada pela metodologia de citometria de fluxo quando comparada aos valores do método de imunocolorimetria. Esse resultado pode estar relacionado às diferenças nas metodologias, principalmente no anticorpo utilizado para a detecção das partículas virais. Além disso, embora os resultados para citometria de fluxo tenham sido normalizados, a quantificação individual de células, decorrente do método, pode resultar num aumento dos valores obtidos, enquanto a metodologia de imunocolorimetria utiliza-se de critério semi-quantitativo, com a contagem do número de poços positivos independente de células marcadas. Assim, os resultados obtidos por citometria de fluxo apresentariam maior sensibilidade que o definido em ensaio imunocolorimétrico. Por fim, quando comparadas às potências médias das duas metodologias entre os tempos estudados, observamos que não houve diferença significativa nos valores obtidos.

Dessa forma, diante dos resultados encontrados, o ensaio de citometria de fluxo, especialmente no tempo de três dias, parece configurar-se como um método alternativo na determinação da potência da vacina tetravalente da dengue, ressaltando a capacidade de utilização dessa metodologia, rápida e sensível, na quantificação de vírus e determinação da infecção celular por partículas virais. A rapidez e eficiência da citometria de fluxo em medir partículas virais também foi observada por outros grupos de pesquisa (HO *et al.*, 2001, KAO *et al.*, 2001; DIAMOND *et al.* 2000).

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O protocolo de diferenciação utilizando 20 ng/mL de PMA demonstrou maior eficiência na diferenciação das linhagens celulares THP-1 e U937 em macrófagos, evidenciada por fatores morfológicos, metabólicos e imunofenotípicos;
- A linhagem celular HEK293T mostrou-se permissiva à infecção com a vacina tetravalente da dengue (Dengvaxia®), enquanto que em células dTHP-1 e dU937 não foi possível detectar infecção pelo vírus vacinal, em ensaios imunocolorimétricos conforme preconizado pelo produtor da vacina;
- Pelo método de imunocolorimetria, foi definida a curva de diluição da célula HEK293T, com isso foi determinada a potência e a identidade de cada sorotipo presente na vacina tetravalente da dengue nos tempos de três e sete dias;
- Ademais, a linhagem celular HEK293T mostrou-se sensível às diferenças entre os sorotipos presentes na vacina, com uma dominância do sorotipo 4 sobre os demais, fato não evidenciado no ensaio padrão;
- Os resultados obtidos nas células HEK293T apresentaram estabilidade nos valores estimados ao longo do tempo, com estimativas próximas de potência vacinal para três e sete dias de incubação. Esse conjunto de achados apontou a linhagem celular HEK293T como uma candidata promissora para o desenvolvimento de metodologias analíticas no estudo, desenvolvimento e controle da qualidade de vacinas tetravalente contra a dengue;
- A metodologia de citometria de fluxo foi viável para a análise da infecção viral, mediante exposição à vacina tetravalente, de células HEK293T, dTHP-1, dU937 e VERO nos tempos de três e sete dias;
- Além disso, a viabilidade do método de citometria de fluxo foi confirmada pela presença de partículas virais nas células infectadas, a partir da exposição de sete dias, com o vírus vacinal, por ensaio de imunofluorescência por microscopia confocal com o anticorpo 4G2;
- Por fim, na comparação entre a metodologia de citometria de fluxo proposta e o ensaio padrão definido pelo produtor, tendo como objetivo determinar a potência da vacina tetravalente da dengue, evidenciou-se que o método de citometria de fluxo é

viável para a definição da potência dessas vacinas, colocando-o como uma metodologia alternativa nos ensaios de infecção com o vírus vacinal.

Em suma, os achados do presente estudo sugerem que: a linhagem celular humana HEK293T é uma candidata em potencial para utilização na determinação da potência e identidade de vacinas tetravalentes contra a dengue, sendo, ainda, capaz de detectar diferenças entre os sorotipos, característica a ser considerada na avaliação de uma vacina tetravalente contra a dengue, cujos anticorpos não neutralizantes podem induzir ao agravamento da doença; e a metodologia de avaliação por citometria de fluxo mostrou-se uma alternativa viável ao ensaio imunocolorimétrico, com semelhança ao método padrão, sendo, contudo, mais rápida e precisa.

8 QUESTÕES EM ABERTO E PERSPECTIVAS

Durante e ao final desse trabalho de pesquisa, surgiram questões que não puderam ser abordadas aqui, mas que contribuiriam, ao nosso entender, enormemente à nossa pesquisa. Sendo assim, baseados nessas perguntas em aberto colocamos as seguintes perspectivas:

Visto que a concentração capaz de infectar células HEK293T e a potência determinada difere em alguns $\log_{10}CCID_{50}/dose$ da potência estimada em células VERO, seria necessário determinar uma faixa de potência específica para HEK293T?

- Determinar faixa de potência para a metodologia de imunocolorimetria com a célula HEK293T;

O fato de as células HEK293T serem menos suscetíveis ao vírus vacinal quando comparadas à VERO poderia ser explicado pela diferença na resposta antiviral dessas células?

- Avaliar resposta imune celular através da dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura, análise de efetores antivirais por citometria e qPCR de genes responsivos ao Interferon tipo 1 (ISRE);

As células VERO não apresentam receptor Fc, já as células HEK293T sim. Seriam os anticorpos neutralizantes gerados pela vacinação também neutralizantes quando testados em células HEK293T e em outras linhagens?

- Determinar a neutralização para cada sorotipo por anticorpos monoclonais específicos em uma ou mais linhagens;

Visando compreender a diferença na infectividade dos sorotipos vacinais, a infectividade do vírus vacinal em células primárias humanas poderia ser comparada com a infectividade obtida nas linhagens de células aqui estudadas?

- Avaliar a infectividade em células primárias humanas (como, por exemplo, PBMC ou hepatócitos).

REFERÊNCIAS

- AKIRA S. TLR signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v. 311, p.1–16, 2006.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p. 499–511, 2004.
- ALDO, P.B. *et al.* Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.70, n. 1, p. 80-86, 2013.
- ALMUQRIN, A. *et al.* SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals low levels of viral backbone gene transcription alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein gene transcription. **Genome Medicine**, v. 13, n. 43, p. 1-17 2021.
- ALVAREZ, D.E. *et al.* Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. **Journal of Virology**, v. 79, n.11, p. 6631-6643, 2005.
- AMORIM, J.H. *et al.* The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus Research**, v.181, p.53–60, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Anvisa registra primeira vacina contra dengue no Brasil**. Brasília: ANVISA, 2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-registra-primeira-vacina-contra-dengue-no-brasil/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=en_US. Acesso em: 04 nov. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Diretoria Colegiada. Resolução DC/ANVISA n. 73 de 21 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 de outubro de 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Imunização. Vacina Dengue: esclarecimentos. **Nota informativa – Vacina Dengue Dengvaxia®**. Brasília: ANVISA, 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201. Acesso em: 29 jul. 2019.
- AREVALO, M.T. *et al.* Primary human endothelial cells support direct but not antibody-dependent enhancement of dengue viral infection. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 3, p. 519–528, 2009.
- ASHOUR, J. *et al.* NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology**, v. 83, p. 5408–5418, 2009.

ASSENBERG R, *et al.* Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **Journal of Virology**, v. 83, n.24, p. 12895-906, 2009.

AVIRUTNAN, P. *et al.* Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. **MBio**, v. 2, p. e00276–00211, 2011.

AVIRUTNAN, P. *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Diseases**, v.193, p.1078–1088, 2006

BAEK, Y.S. *et al.* Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. **BMC Immunology**, v. 10, n. 18, 2009.

BALMASEDA, A. *et al.* Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73(6), p.1059-62, 2005.

BARBACHANO-GUERRERO, A.; ENDY, T.; KING, C. Dengue virus non-structural protein 1 activates the p38 MAPK pathway to decrease barrier integrity in primary human endothelial cells. **Journal of General Virology**, 2020.

BARNETT, R. Dengue. **The Lancet**, v. 390, n. 10106, p. 1941, 2017.

BARRETT, P. N. *et al.* Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. **Expert Reviews of Vaccines**, v.8(5), p. 607-618, 2009.

BAUM, A., GARCÍA-SASTRE, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. **Amino Acids**, v.38, p.1283–1299, 2010.

BENTE, D.A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discovery Today Disease models**, v. 3, n. 1, p. 97 – 103, 2006.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504–7, 2013.

BISWAL, S. *et al.* Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, p. 2009- 2019, 2019.

BRANDLER, S. *et al.* Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 74-81, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 3, 2021a. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf . Acesso em: 09 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 20, 2021b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/31/boletim_epidemiologico_svs_20.pdf . Acesso em: 06 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 2, 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 2, 2018. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf> . Acesso em: 06 jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Dengue. **Transmissão**. Brasília: MS, 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/links-de-interesse/301-dengue/14607-transmissao>. Acesso em: 18 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, 2016. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>. Acesso em: 18 out. 2017.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, 20 de setembro de 1990.

BROWN, M.G. *et al.* Dengue Virus Infection of Mast Cells Triggers Endothelial Cell Activation. **Journal of Virology**, v.85, n. 2, p.1145–1150, 2011.

CASA DE OSWALDO CRUZ. Departamento de Arquivo e Documentação. **Aspecto do combate ao mosquito pelo Serviço de Profilaxia da Febre Amarela**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. Disponível em: <http://arch.coc.fiocruz.br/index.php/aspecto-do-combate-ao-mosquito-pelo-servico-de-profilaxia-da-febre-amarela-3>. Acesso em: 06 jun. 2021.

CASA DE OSWALDO CRUZ. Departamento de Arquivo e Documentação. **Oswaldo Cruz em 1903**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015. Disponível em: <http://www.arch.coc.fiocruz.br/index.php/oswaldo-cruz-em-1903>. Acesso em: 06 jun. 2021.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue. **Epidemiology**. [Atlanta]: CDC, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>. Acesso em: 18 out. 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue. **Clinical Guidance**. [Atlanta]: CDC, 2014b. Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/clinical.html>. Acesso em 26 out. 2017.

CERVANTES-SALAZAR, M. *et al.* Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. **Virology**, v.484, p. 113-126, 2015.

CHAMBERS, T.J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Immunology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANPUT, W.; MES, J.J.; WICHERS, H.J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 37-45, 2014.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 365-375, 2007.

CHEN, J.; NG, M.M.; CHU, J.J.H. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection. **PLoS Pathogens**, v.11, n. 7, p.e1005053, 2015.

CHU, H. *et al.* CD8+ T-cell Responses in Flavivirus-Naive Individuals Following Immunization with a Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p.1618-28, 2015.

CHUANG, Y.C. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p.222–231, 2011.

COSTA, V.V. *et al.* Dengue virus-infected dendritic cells, but not monocytes, activate natural killer cells through a contact-dependent mechanism involving adhesion molecules. **mBio**, v. 8, p. e00741–00717, 2017.

CRUZ-OLIVEIRA, C. *et al.* Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155-170, 2015.

CUI, K. *et al.* Distinct Migratory Properties of M1, M2, and Resident Macrophages Are Regulated by α D β 2 and α M β 2 Integrin-Mediated Adhesion. **Frontiers in Immunology**, v.9, p. 2650, 2018.

DAIGNEAULT, M. *et al.* The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, 2010.

DAYAN, G.H. *et al.* Assessment of bivalent and tetravalent dengue vaccine formulations in flavivirus-naive adults in Mexico. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.10, n. 10, p.2853-2863, 2014.

DEAUVIEAU, F. *et al.* Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 144-154, 2007.

DENG, S.Q. *et al.* A Review on Dengue Vaccine Development. **Vaccines**, v. 8, n. 1, 2020.

DENGUE VACCINE INITIATIVE. Development of Dengue Vaccine. A review of the status and future considerations. **Report of the Americas Dengue Prevention Board Meeting**. Bogotá, Colômbia, 2015. Disponível em <http://www.denguevaccines.org/sites/default/files/Americas%20Dengue%20Prevention%20Board%20-%20Bogota%202015.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

DENGUE VACCINE INITIATIVE. **Vaccine Development**. Disponível em: <http://www.denguevaccines.org/vaccine-development>. 2016. Acesso em: 24 maio 2016.

DESMYTER, J.; MELNICK, J.L.; RAWLS, W.E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). **Journal of Virology**, v. 2, n. 10, p. 955–961, 1968.

DIAMOND, M.S. *et al.* Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of Virology*, v. 74, n. 17, p. 7814-7823, 2000.

DIAMOND, M.S.; HARRIS, E. Interferon Inhibits Dengue Virus Infection by Preventing Translation of Viral RNA through a PKR-Independent Mechanism. **Virology**, v. 289, p. 297-311, 2001.

DIAZ, M.O. *et al.* Homozygous deletion of the α - and β 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, n. 14, p. 5259-63, 1988.

DICK, O. B. *et al.* Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

DIPASQUALE, L.C.; HAYES, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A.W. **Hayes' Principles and methods of toxicology**. 4. ed. London: Taylor & Francis, 2001. Cap. 18, p. 853-916.

DuBRIDGE, R.B. *et al.* Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. **Molecular and Cellular Biology**, v.7, n. 1, p.379-387, 1987.

ENDY, T.P. *et al.* Spatial and Temporal Circulation of Dengue Virus Serotypes: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 52-59, 2002.

FERNANDEZ-GARCIA, M.D. *et al.* Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus engage distinct entry mechanisms and differentially stimulate antiviral immune responses. **mBio**, v.7, n. 1, p. 1956-15, 2016.

FINSTAD, H.S. *et al.* Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. **Biochemical Journal**, v. 336, part 2, p. 451-459, 1998.

FLYNN, J.; GORRY, P. Flow Cytometry Analysis to Identify Human CD8+ T Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 2048, p. 1-13, 2019.

FRESHNEY, R. I. Basic principles of cell culture. **Culture of cells for tissue engineering**, p. 11-14, 2006.

FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin-complement pathway—its role in innate immunity and evolution. **Immunological Reviews**, v.198, p.185–202, 2004.

GAILHARDOU, S. *et al.* Safety overview of a recombinant live-attenuated tetravalent dengue vaccine: pooled analysis of data from 18 clinical trials. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004821, 2016.

GALULA, J.U. *et al.* Does structurally-mature dengue virion matter in vaccine preparation in post-Dengvaxia era? **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.19, n. 10, p. 2328-2336, 2019.

GIBBONS, R.V. *et al.* Dengue and US Military Operations from the Spanish–American War through Today. **Emerging infectious diseases**, v.18, n. 4, p. 623 – 630, 2012.

GRAHAM, F.L. *et al.* Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. **Journal of General Virology**, v.36, p.59-72, 1977.

GREEN, A.M. *et al.* Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 6, p. 1148-1160, 2014.

GREEN, S. *et al.* Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.1429–1435, 1999.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v.33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUEVARA, I. *et al.* Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n.2, p. 177-188, 2008.

GUO, Q. *et al.* The plasticity and potential of leukemia cell lines to differentiate into dendritic cells (Review). **Oncology Letters**, v. 4, p. 595-600, 2012.

- GUY, B. *et al.* Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*, v. 26, n. 5, p. 5712–21, 2008.
- GUY, B. Immunogenicity of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Journal of Clinical Virology**, v.46, n. 2, p.S16-S19, 2009.
- GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Human Vaccines**, v. 6, n. 9, 2010.
- GUY, B. *et al.* Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 2, p. 51-64, 2011
- GUY, B. *et al.* Vaccination Against Dengue: Challenges and Current Developments. **Annual Review of Medicine**, v.67, p. 387-404, 2016.
- GUY, B.; JACKSON, N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. **Nature Reviews Microbiology**, v 14, n.1, p. 45–54, 2016.
- GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v.385, n. 9966, p. 453-465, 2015.
- GUZMAN, M.G.; VAZQUEZ, S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Viruses**, v.2, p. 2649-2662, 2010.
- GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 33 - 42, 2002.
- HADINEGORO, S.R. *et al.* Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **The New England Journal of Medicine**, 373 (13), p. 1195-1206, 2015.
- HADINEGIRO, S.R.S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatrics and International Child Health**, v.32, Suppl 1, p.33-8, 2012.
- HALSTEAD, S.B. *et al.* Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, n. 10, p. 712-722, 2010.
- HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n.6, p. 407- 415, 2006.
- HALSTEAD, S.B.*et al.* Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine*, v.23, n. 7, p. 849 -56, 2005.
- HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v.239, n. 4839, p. 476-81, 1988.
- HAN, S. Clinical vaccine development. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 4, n. 1, p. 46-53, 2015.

- HARENBERG, A. *et al.* Persistence of Th1/Tc1 responses one year after tetravalent dengue vaccination in adults and adolescents in Singapore. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 11, p. 2317–2325, 2013.
- HENEIN, S. *et al.* Dissecting antibodies induced by a Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetravalent Dengue Vaccine (CYD-TDV) in naïve and Dengue-Exposed individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v.215, n. 3, p.351-358, 2017.
- HERMIDA, M.E.R. **Fagócitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de leishmania em hospedeiros vertebrados**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Bahia, 2007.
- HERINGER, M. *et al.* Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 4, p. 268-274, 2015.
- HO, L.J. *et al.* Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v.166, p.1499–1506, 2001.
- HOLMES, E.C.; BURCH, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 74-77, 2000.
- HUANG, Y.H. *et al.* Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p.71–75, 2000.
- HUANG, C.Y.-H. *et al.* Genetic and phenotypic characterization of manufacturing seeds for tetravalent dengue vaccine (DENVax). **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V.7, n. 5, p. e2243, 2013.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. **Frontiers in Immunology**, v.5, article 514, 2014.
- JARATSITTISIN, J. *et al.* Activity of vitamin D receptor agonists against dengue virus. **Scientific reports**, v.10, p. 10835, 2020.
- JESSIE, K. *et al.* Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 2004.
- JIANG, L.; SUN, Q. The Role of Autophagy-Mediated Dengue Virus Antibody-Dependent Enhancement Infection of THP-1 Cells. **Intervirolgy**, v. 63, n. 1-6, p. 57-65, 2020.

JIN, X. *et al.* Dengue vaccine development and dengue viral neutralization and enhancement assays. **Antiviral Therapy**, v. 14 p. 739-749, 2009.

JITOBOAM, K. *et al.* Actin interacts with Dengue Virus 2 and 4 Envelope Proteins. **PLOS One**, v. 11, n. 3, p.1-18, 2016.

JONES, M. *et al.* Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5414–5420, 2005.

JOST, S.; ALTFELD, M. Control of human viral infections by natural killer cells. **Annual Review of Immunology**, v.31, p.163–194, 2013.

JUNO, J.A.; KEYNAN, Y.; FOWKE, K.R. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002838, 2012.

KALLAS, E.G. *et al.* Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v.20, n. 7, p. 839-850, 2020.

KAO, C.L. *et al.* Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.10, p.3672-3677, 2001.

KASVI. **A importância da qualidade para o cultivo celular.** São José do Pinhais, 2017. Disponível em: <http://www.kasvi.com.br/qualidade-cultivo-celular/>. Acesso em: 10 abr. 2019.

KIRKPATRICK, B. *et al.* The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. **Science Translational Medicine**, v. 8:330ra336, 2016.

KITAB, B.; KOHARA, M.; TSUKIYAMA-KOHARA, K. Experimental in vitro and in vivo systems for studying the innate immune response during dengue virus infections. **Archives of Virology**, v.163, n. 7, p. 1717-1726, 2018.

KOURI, G.P.; GUZMAN, M.G.; BRAVO, J.R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba?2. An integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 821-823, 1987.

KUMAR, S. *et al.* Quality control of vaccines – A journey from classical approach to 3Rs. **Microbiology: Current Research**, v. 2, n. 3, p. 45-61, 2018.

KURANE, I. *et al.* Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Virology**, v. 52, p.223–230, 1984.

LAM, S.K. Challenges in reducing dengue burden; diagnostics, control measures and vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 9, p. 995-1010, 2013.

LAMBETH, C.R. *et al.* Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3267-3272, 2005.

LAOPRASOPWATTANA, K. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 8, p. 1108-16, 2007.

LAURENT-ROLLE, M. *et al.* The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by Type I interferon. **Cell Host & Microbe**, v. 16 n. 3, p. 314-327, 2014.

LECOUTURIER, V. *et al.* Characterization of recombinant yellow fever-dengue vaccine viruses with human monoclonal antibodies targeting key conformational epitopes. **Vaccine**, v.37, n. 32, p. 4601-4609, 2019.

LIBRATY, D.H. *et al.* Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3501–3508, 2001.

LIBRATY, D.H. *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, n. 8, p.1165–1168, 2002.

LIEBHABER, H.; RIORDAN, J.T.; HORSTMANN, D.M. Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.125, p. 636–643, 1967.

LIMA-CAMARA, T.N. *et al.* Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. **Parasite & Vectors**, v. 7, n. 304, p. 1-8, 2014.

LIN, S. W. *et al.* Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **J. Infect.**, v. 64, p. 325–334, 2012.

LIU, Y.; LIU, J.; CHENG, G. Vaccines and Immunization Strategies for Dengue Prevention. **Emerging Microbes Infections**, v. 5, p. e77, 2016.

LOO, Y.M.; GALE, M.Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, v. 34, p. 680–692, 2011.

LOPES, T.R.R. *et al.* Dengue in Brazil in 2017: what happened? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

LOUIS, N.; EVELEGH, C.; GRAHAM, F.L. Cloning and Sequencing of the Cellular-Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line. **Virology**, v.233, p.423-429, 1997.

LOZACH, P.Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-708, 2005.

LUO, D.; VASUDEVAN, S.G.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, v.118, p. 148-158, 2015.

LUPLERTLOP, N. *et al.* Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. **Embo Reports**. v. 7, n. 11, p.1176–1181, 2006.

MA, L. *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n. 10, p. 3414-3419, 2004.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v.220, n. 1, p. 232-240, 1996.

MALM, M. *et al.* Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. **Scientific Reports**, v.10, p. 18996, 2020.

MAROVICH, M. *et al.* Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 219–224, 2001.

MATANGKASOMBUT, P. *et al.* Invariant NKT cell response to dengue virus infection in human. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2955, 2014.

MATHEW, A. Defining the role of NK cells during dengue virus infection. **Immunology**, v. 154, n. 4, p. 557-562, 2018.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A.L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, p. 300-313, 2008.

McLINDEN, J.H. *et al.* Yellow Fever Virus, but not Zika Virus or Dengue Virus, inhibits T-Cell Receptor-Mediated T-Cell Function by an RNA-based Mechanism. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 9, p. 1164-1175, 2017.

MEDIN, C.L.; FITZGERALD, K.A.; ROTHMAN, A.L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **Journal of Virology**, v. 79, p. 11053–11061, 2005.

METZ, B. *et al.* Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, p. 2411–2430, 2002.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p.21-30, 2003.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro**: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012. 68 f. Monografia (Graduação em Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MILIÁN, E. *et al.* Accelerated mass production of influenza virus seed stocks in HEK-293 suspension cell cultures by reverse genetics. **Vaccine**, v. 35, n. 26, p. 3423 – 3430, 2017.

MILLS, C.D. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-73, 2000.

MIRANDA, D.P., HENRIQUES, C.M.P. Imunobiológicos e Vigilância Sanitária. *In*: BUSS P.M. (org.). **Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, cap. 6, p. 125-130, 2005.

MODHIRAN, N. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**. v.7, p. 304ra142–304ra142, 2015.

MONATH, T.P. *et al.* ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) – a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. Journal of Infectious Diseases*, v.8, n. 2, p.31-44, 2004.

MONTOMOLI, E. *et al.* Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. **Expert Reviews of Vaccines**, v.11, p.587–594, 2012.

MOREIRA, W.C. *et al.* Alternative potency tests for quality control of immunobiologicals: a critical review of the validation approach. **Visa em Debate**, v.8, n. 1, p. 48-61, 2020.

MORRISON, J.; GARCÍA-SASTRE, A. STAT2 signaling and dengue virus infection. **JAK-STAT**, v. 3, p. e27715, 2014.

MULLER, D.A.; YOUNG, P.R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v.98, n. 2, p.192-208, 2013.

MURIRA, A.; LAMARRE, A. Type-I Interferon Responses: From Friend to Foe in the Battle against Chronic Viral Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 609, 2016.

MURPHY, B.R.; WHITEHEAD, S.S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 587-619, 2011.

MURRELL, S.; WU, S.C; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p.239-47, 2011.

NAGILA, A. *et al.* Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF-alpha secretion and apoptosis. **Virology Journal**, v. 10, article. 105, 2013.

NASCIMENTO, E. J. M. *et al.* Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. **PLoS ONE**, v. 4, p. e6782, 2009.

NASIRUDEEN, A.M.A. *et al.* RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an importante role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, e926, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. [Bethesda]: NIH, 2016. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/dengue-vaccine-enters-phase-3-trial-brazil>. Acesso em: 10 abr. 2021.

NICHOLSON, B. *et al.* Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.19, p. 15881-15885, 2001.

NOGUEIRA, R.M.R. *et al.* Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1376-1381, 2005.

NOMAGUCHI, M. *et al.* De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8831-8842, 2003.

OLIVEIRA, R.A.S. *et al.* Previous dengue or Zika virus exposure can drive to infection enhancement or neutralisation of other flaviviruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

OLIVEIRA, E.R.A. *et al.* Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology**, v. 489, p. 95-107, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines and diseases. Immunization, Vaccines and Biologicals. **Dengue**. 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/en/>. Acesso em: 09 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Media Centre. Fact sheets. **Dengue and Severe dengue**. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 09 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Media Centre. Fact sheets. **Dengue and Severe dengue**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 22 set. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines and Diseases. Immunization, Vaccines and Biologicals. **Revised SAGE recommendation on use of dengue vaccine**. 2018. Disponível em: https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised_SAGE_recommendation_s_dengue_vaccines_apr2018/en/. Acesso em: 30 jul. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue Control. **Epidemiology**. 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acesso em: 16 out. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue Explorer**. 2017b. Disponível em: <https://ntdhq.shinyapps.io/dengue5/>. Acesso em: 09 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue Control. **The mosquito**. 2017c. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>. Acesso em: 21 out. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines. Biologicals. Clinical evaluation of vaccines. **Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations**. WHO technical report series nº 1004, annex 9. 2017d. Disponível em: https://www.who.int/biologicals/expert_committee/WHO_TRS_1004_web_Annex_9.pdf?ua=1. Acesso em: 17 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated)**. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 932. 2013. (Technical Report Series, No. 979). Disponível em: https://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_979_62nd_report.pdf. Acesso em: 21 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated)**. Proposed replacement of Annex 1. 2011. (Technical Report Series, No. 932). Disponível em: http://www.who.int/biologicals/vaccines/Dengue_DB_5_April_2012_clean.pdf. Acesso em: 28 jun. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Immunization, Vaccines and Biologicals. **Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic áreas**. (WHO/IVB/08.12) 2008. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69850/WHO_IVB_08.12_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 17 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue**: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Acesso em: 17 maio 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. **Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses**. WHO/IVB/07.07. Geneva, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidelines for the production and quality control of candidate tetravalent dengue virus vaccines (live)**. Geneva, 2006. (Technical Report Series, No. 932). Disponível em:

http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/dengue/TRS932Annex%201_Dengue%20virus%20vacc%20live.pdf. Acesso em: 17 maio 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines. Biologicals. Nonclinical evaluation of vaccines. **Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines**. WHO technical report series n^o 927, annex 1, 2005. Disponível em: https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1. Acesso em: 15 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue haemorrhagic fever**: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization. 1997. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>. Acesso em: 27 out. 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Organização Mundial da Saúde. Epidemiological update: **Dengue**. Washington, D.C: PAHO/ WHO, 2020a. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-dengue-7-february-2020>. Acesso em: 06 jun. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Epidemiological Updates: **Dengue in the context of COVID-19**. Washington, D.C.: PAHO/ WHO, 2020b. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-dengue-context-covid-19-3-december-2020>. Acesso em: 09 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Epidemiological Updates: **Arbovirus**. Washington, D.C.: PAHO/ WHO, 2020c. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-dengue-and-other-arboviruses-10-june-2020>. Acesso em: 09 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Dengue**: epidemiological alerts and updates. 13 September 2019: Epidemiological update. Washington, D.C.: PAHO/ WHO, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=50321-13-september-2019-dengue-epidemiological-update&Itemid=270&lang=en. Acesso em: 22 set. 2019.

O'RYAN, M. Rotarix (RIX4414): an oral human rotavirus vaccine. **Expert Reviews of Vaccines**, v.6, p. 11-19, 2007.

OSADA, N. *et al.* The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. **DNA Research**, v.21, p.673-683, 2014.

OSANAI, C.H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.

PAES, M.V. *et al.* Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, v. 338, n. 2, p. 236-246, 2005.

PAES, M.V. *et al.* Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Laboratory Investigation**, v.89, n. 10, p. 1140-1151, 2009.

PARK, E.K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, v. 56, n.1, p.45-50, 2007.

PASCAPURNAMA, D.N. *et al.* Induction of Osteopontin by Dengue Virus-3 Infection in THP-1 Cells: Inhibition of the Synthesis by Brefelamide and Its Derivative. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 521, 2017.

PATEL, U. *et al.* Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 1, p. 186-193, 2017.

PERERA, R.; KUHN, R.J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n. 4, p. 369-377, 2008.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R.J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v.80, n. 1, p. 11-22, 2008.

PICHYANGKUL, S. *et al.* A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. **Journal of Immunology**, v.171, n. 10, p. 5571–5578, 2003.

PLOTKIN, S.A.; PLOTKIN, S.L. The development of vaccines: how the past led to the future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 889, 2011.

POTISOPON, S. *et al.* The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 18, p.11642 -11656, 2014.

PRECIOSO, A.R. *et al.* Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v.33, p. 7121-7125, 2015.

QI, R.F.; ZHANG, L.; CHI, C. W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophys Sinica**, v.40, n. 2, p. 91-101, 2008.

RAGHUPATHY, R. *et al.* Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **Journal of Medical Virology**, v. 56, p. 280–285, 1998.

RANHEIM, T. *et al.* Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq). **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 2. p. 193-201, 2006.

RATTANACHUEN, W. *et al.* The contribution of host cells to dengue virus infectivity. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, p.117-122, 2011.

REITER, P. Yellow fever and dengue: a threat to europe? **Euro Surveill**, v. 15, n. 9, p. 19509, 2010.

RHIM, J.S.; SCHELL, K. Cytopathic and plaque assay of rubella virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.125, p.602–606, 1967.

RHIM, J.S. *et al.* Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero), **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.132, p.670–678, 1969.

RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v.174, n. 2, p. 479-93, 1990.

RIGAU-PEREZ, J.G. *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v.352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

RIVAS, G.B.S. *et al.* Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. **Journal of Biological Rhythms**, v.33, n. 3, p. 272-288, 2018.

RIVINO, L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v.15, n.4, p. 443-453, 2016.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.26, p.337-343, 1977.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946-951, 2004.

RUNGRUENGPOL, C. *et al.* Evidence of plasticity in the dengue virus: Host cell interaction. **Microbial Pathogenesis**, v.86, p.18–25, 2015.

RUSH, B. An Account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. *In: MEDICAL Inquires and Observations.* Philadelphia: Prichard and Hall, 1789. p. 89-100.

SALLES, T S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 264, p. 2-12, 2018.

SAMANTA, J.; SHARMA, V. Dengue and its effects on liver. **World Journal of Clinical Cases**, v.3, p. 125–131, 2015.

SANG, Y.; MILLER, L.C.; BLECHA, F. Macrophage polarization in virus-host interactions. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 6, n. 2, 2015.

SAN MARTIN, J. L. *et al.* The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.

SANTOS, J. E. *et al.* Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 613–621, 2011.

SASAKI, K.; MAKINO, S.; KASAHARA, S. Studies on measles virus. II. Propagation in two established simian renal cell lines and development of a plaque assay. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v.37, p.27–42, 1964.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M. TRAVASSOS DA ROSA AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 81, v. 2, p. 245–6, 1986.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3 Rs (Refinement, reduction and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, supl, p. S85-S94, 2002.

SCHWARTZ, L.M. *et al.* The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. **Vaccine**, v. 33, n. 29, p. 3293-3298, 2015.

SCHWENDE, H. *et al.* Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 555–561, 1996.

SEHRAWAT, P. *et al.* Role of cytokines as molecular marker of dengue severity. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 10, p. e2018023, 2018.

SERBINA, N.A. *et al.* Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. **The Annual Review of Immunology**, v.26, p. 421-452, 2008.

SETH, R. B. *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. **Cell**, v.122, p. 669–682, 2005.

SHARP, T. M.; PEREZ-PADILLA, J.; WATERMAN, S. H. Infectious diseases related to travel. *In*: CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Dengue**. [Atlanta]: CDC, 2015. Chapter 4. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/dengue>. Acesso em: 8 jun. 2016.

SILER, J.F.; HALL, M.W.; HITCHENS, A.P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. **Philippine Journal of Science**, v. 29, p. 1-304, 1926.

SIMIZU, B.; RHIM, J.S.; WIEBENGA, N.H. Characterization of the Tacaribe group of arboviruses. I. Propagation and plaque assay of Tacaribe virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 125, p.119–123, 1967.

SINGH, K.; MEHTA, S. The clinical development process for a novel preventive vaccine: An overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 62, n. 1, p. 4, 2016.

SLIFKA, M.K.; AMANNA, I.J. Dengue Serostatus and Dengue Vaccine Safety and Efficacy. **The New England Journal of Medicine**, v.379, n. 20, p. 1968, 2018.

SOLOVJOV, D.A.; PLUSKOTA, E.; PLOW, E.F. Distinct Roles for the α and β Subunits in the Functions of Integrin α M β 2*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1336-1345, 2005.

SPANO A, BARNI S, SCIOLA L. PMA withdrawal in PMA-treated monocytic THP-1 cells and subsequent retinoic acid stimulation, modulate induction of apoptosis and appearance of dendritic cells. **Cell Proliferation**, v. 46 (3), p.328-347, 2013.

STARR, T. *et al.* The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. **PLoS One**, v.13, n.3, 2018.

ST JOHN, A.L. *et al.* Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 22, p. 9190–9195, 2011.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. **International journal of infectious diseases**, v.84S, p. S80-S86, 2019.

SWANSTROM, J. *et al.* Analyzing the human serum antibody responses to a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, p. 1932-1941, 2018.

TAFFS, R.E. Potency Tests of Combination. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, suppl. 4, p.362-366, 2001.

TASSANEETRITHEP, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

TEMPORÃO, J.G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n. 5, p. 938-40, 2011.

THANACHARTWET, V. *et al.* Identification of clinical factors associated with severe dengue among Thai adults: a prospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 420, 2015.

THEUS, S.A.; CAVE, M.D.; EISENASH, K.D. Activated THP-1 Cells: an Attractive Model for the Assessment of Intracellular Growth Rates of Mycobacterium tuberculosis Isolates. **Infection and Immunity**, v.72, n. 20, p. 1169-1173, 2004.

THIEL, S. *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v.386, p. 506-510, 1997.

THOMAS, S.J. Developing a dengue vaccine: progress and future challenges. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1323, p. 140-159, 2014.

TOWNSLEY, E. *et al.* Interaction of a dengue virus NS1-derived peptide with the inhibitory receptor KIR3DL1 on natural killer cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v.183, p. 419–430, 2015.

TRICOU, V. *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in children aged 2–17 years: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. **The Lancet**, v.395, n. 10234, p. 1434-1443, 2020.

TSAI, C.Y. *et al.* Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.46, n. 4, p.271-281, 2013.

TSAI, W.Y. *et al.* Complexity of neutralizing antibodies against multiple dengue virus serotypes after heterotypic immunization and secondary infection revealed by in-depth analysis of cross-reactive antibodies. **Journal of Virology**, v. 89, p. 7348–7362, 2015.

UMAREDDY, I. *et al.* Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of General Virology**, v.87, p. 2605-2614, 2006.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A.B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, n. 2, p. 253-261, 2011.

VADDADI, K. *et al.* Co-circulation and co-infections of all dengue virus serotypes in Hyderabad, India 2014. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 12, p.2563-2574, 2017.

VAN DER SCHAAR, H.M. *et al.* Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007.

VANNICE, K.S.; DURBIN, A.; HOMBACH, J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2934-2938, 2016.

VERVAEKE, P.; VERMEIRE, K.; LIEKENS, S. Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 50–67, 2015.

VILLAR, L. *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, v.372, n. 2, 2015.

VON SYDOW, F.F.O. *et al.* Comparison of Dengue Infection in Human Mononuclear Leukocytes with Mosquito C6/36 and Mammalian Vero Cells Using Flow Cytometry to Detect Virus Antigen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n. 4, p. 483-489, 2000.

WAHALA, W.M.P.B.; SILVA, A.M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374–2395, dez. 2011.

WANG, J. P. *et al.* Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **Journal of Immunology**, v.177, p. 7114–7121, 2006.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-9, 2014.

WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p.523 – 540, 2009.

WHITE, L.J. *et al.* Defining levels of dengue virus serotype-specific neutralizing antibodies induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TAK-003). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.15, n. 3, p. 1-15, 2021.

WHITEHEAD, S.S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528 2007.

WILDER- SMITH A. Dengue vaccine development: status and future. **Bundesgesundheitsb Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v.63, p. 40-44, 2020.

WODI, A. P.; MORELLI, V. Principles of Vaccination. Immunology of Vaccine-Preventable Diseases. *In*: CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases**. [Atlanta]: CDC, 14. ed. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/prinvac.html>. Acesso em: 18 jun. 2016.

WU, S.J. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v.6 p.816-820, 2000.

WU, M.F.; CHEN, S.T.; HSIEH, S.L. Distinct regulation of dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophage subsets. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 36, 2013.

XUE, Q. *et al.* Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.12, 3805, 2018.

YAKASS, M.B.; FRANCO, D.; QUAYE, O. Yellow Fever Virus Down-Regulates mRNA Expression of SOCS1 in the initial phase of infection in Human Cell Lines. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 802, 2020.

YAMAMOTO, T. *et al.* Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. **Leukemia**, v.23, p. 761-769, 2009.

- YANG, J. *et al.* A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. **Nature**, v. 586, p. 572–577, 2020.
- YANG, S.J. *et al.* Activation of M1 macrophages in response to recombinant TB vaccines with enhanced antimycobacterial activity. **Frontiers in Immunology**, v. 11:1298, 2020.
- YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro, **Nihon Rinsho**, v.21, p.1201–1215, 1963.
- YOHAN, B. *et al.* Growth characteristics and cytokine/chemokine induction profiles of dengue viruses in various cell lines. **Acta Virologica**, v.58, n. 1, p. 20-27, 2014.
- ZEIDLER, J.D. *et al.* Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 42, 2017.
- ZELLWEGER, R.M. *et al.* Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. **PloS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-e80, 2010.
- ZHOU, L. *et al.* Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 335, n. 1-2, p. 283-289, 2010.

ANEXO A – MEDIDA DA ÁREA CITOPLASMÁTICA DAS CÉLULAS THP-1 E U937 TRATADAS E NÃO TRATADAS COM PMA

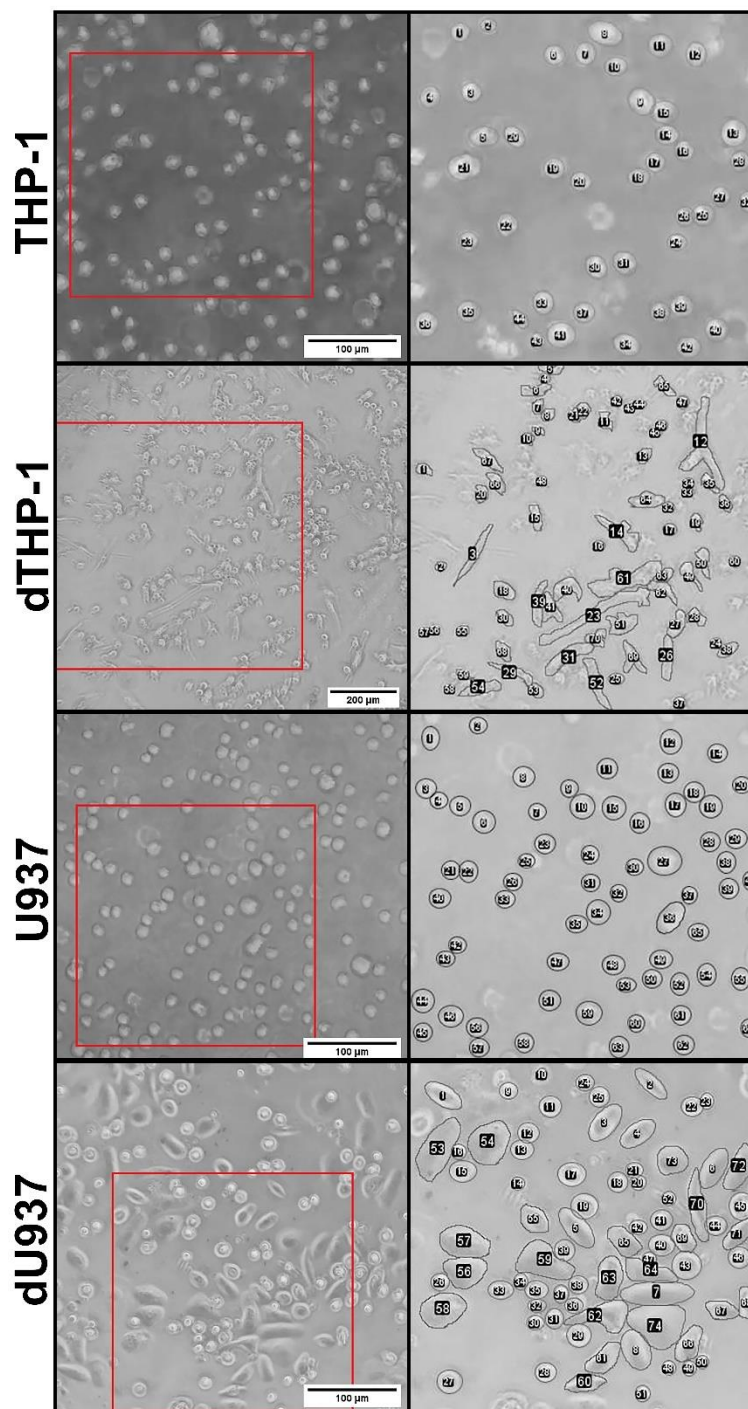
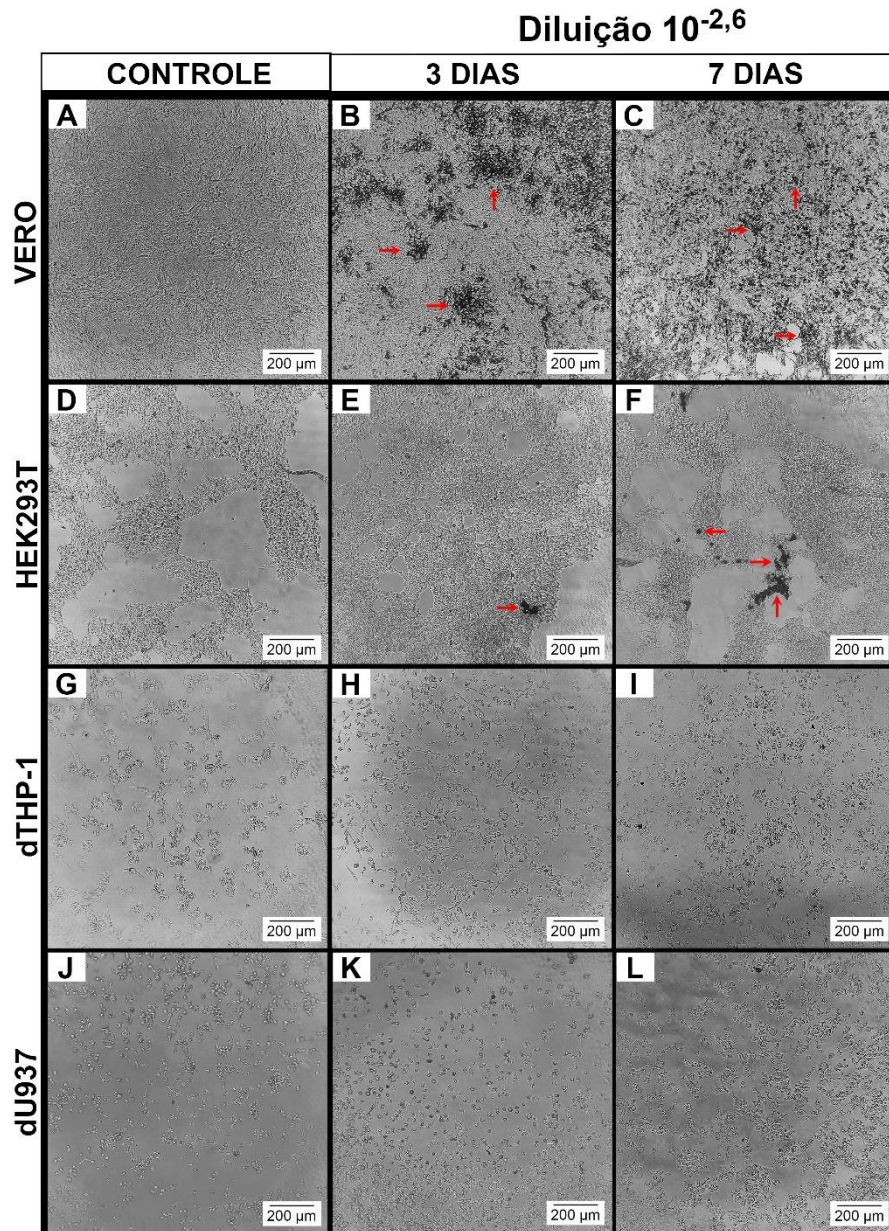


Figura representativa com marcação em vermelho da área utilizada para quantificação das células, monócitos não tratados (THP-1 e U937) e tratados com PMA (dTHP-1 e dU937) na concentração de 20 ng/mL por 48h. Imagens representativas obtidas com microscópio Olympus, aumentos de 100X para monócitos THP-1 e U937 e U937 tratados com PMA e de 40 X para THP-1 tratados com PMA.

Fonte: (A autora, 2021).

**ANEXO B – INFECÇÃO COM O SOROTIPO 2 DO VÍRUS VACINAL DA DENGUE,
NA DILUIÇÃO $10^{-2,6}$, EM CÉLULAS HEK293T, dTHP-1, dU937 E VERO POR
IMUNOCOLORIMETRIA**



Legenda: Células VERO, HEK293T, dTHP-1 e dU937 infectadas com o vírus vacinal da dengue para o sorotipo 2 na diluição $10^{-2,6}$ durante três e sete dias de incubação, por imunocolorimetria. Células VERO controle (A), células HEK293T controle (D), células dTHP-1 controle (G) e células U937 controle (J). Infecção viral no tempo de 3 dias para as células VERO (B), células HEK293T (E), células dTHP-1 (H) e dU937 (K); para 7 dias células VERO (C), células HEK293T (F), células dTHP-1 (I) e dU937 (L) coradas com mAb anti-DENV-2. Setas vermelhas indicam infecção viral. Imagens representativas obtidas no microscópio Olympus com ampliação de 100X.

Fonte: (A autora, 2021).