

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

Lucas de Siqueira Penna Quintaes

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR HEK293T EM
ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE
COMO ALTERNATIVA À LINHAGEM CELULAR VERO**

Rio de Janeiro

2021

Lucas de Siqueira Penna Quintaes

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR HEK293T EM
ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE
COMO ALTERNATIVA À LINHAGEM CELULAR VERO

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Anna Christina Rosa Guimarães

Preceptor: Renata Faria de Carvalho

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Quintaes, Lucas de Siqueira Penna

Avaliação da aplicabilidade da linhagem celular HEK293T em ensaio de potência da vacina tetravalente contra a dengue como alternativa à linhagem celular VERO. / Lucas de Siqueira Penna
Quintaes. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

59 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Tutora: Anna Christina Rosa Guimarães.

Preceptora: Renata Faria de Carvalho.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dengue. 2. Vacina tetravalente. 3. Potência. 4. Células HEK293T. 5. Células VERO. I. Título.

Evaluation of the applicability of HEK293T cell line in a potency assay for tetravalent vaccine against dengue as an alternative to VERO cell line.

Lucas de Siqueira Penna Quintaes

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR HEK293T EM
ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE
COMO ALTERNATIVA À LINHAGEM CELULAR VERO

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 26/02/2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fausto Klabund Ferrais

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

D.ra Catia Ines Costa

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Wildeberg Cal Moreira

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

M.^a Anna Christina Rosa Guimarães – (Tutor)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

M.^a Renata Faria de Carvalho – (Preceptor)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho à minha querida avó, Maria Elza de Siqueira Penna, que tanto estimulou e apoiou todas as minhas ações e decisões e segue para sempre me guiando em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio e carinho durante toda a trajetória.

Às minhas orientadoras, Renata Faria de Carvalho e Anna Christina Rosa Guimarães, pela orientação, conselhos, direcionamentos e aprendizado durante esses dois anos de trabalho.

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

Às minhas queridas colegas, e amigas, de trabalho, Camila Coelho Carmo, Letícia Mitiko Kobayashi, Danielle Sophia Ferreira Santos Braga e Thaís de Cassia de Souza Su que tanto contribuíram, colaboraram e ajudaram na realização desse trabalho, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de grande importância para a saúde pública global, afetando mais de 100 países e deixando sob risco mais de 40% da população mundial. No Brasil, até a semana epidemiológica 36 foram quase um milhão de casos, com 484 óbitos e a circulação dos quatro sorotipos da doença. Nesse contexto, a busca por uma vacina tetravalente, para os quatro sorotipos da doença, eficaz contra o vírus da dengue (DENV) tornou-se prioridade global em saúde. Diversas vacinas estão em desenvolvimento no mundo, contudo a Dengvaxia®, produzida pelo laboratório Sanofi-Pasteur (França), é a primeira vacina tetravalente a possuir registro no Brasil, e em mais outros 20 países no mundo. Em seus estudos clínicos de fase I, II e III e pós-registro, a vacina mostrou eficácia contra os quatro sorotipos virais, contudo foi observada uma imunodominância do sorotipo 4 vacinal sobre os demais. No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cabe ao Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) garantir a qualidade e a liberação de cada lote de vacina consumido no país, avaliando critérios de qualidade como potência, identidade, termoestabilidade, e outros. A determinação da potência da Dengvaxia® baseia-se em ensaio de dose infectante de 50% de cultura de células (CCID50%) a partir de células VERO. Contudo, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a potência de vacinas tetravalente contra a dengue pode ser determinada em células VERO ou outra sensível ao vírus vacinal. Diante disso, o presente trabalho busca avaliar a aplicabilidade da linhagem celular HEK293T, que possui sensibilidade ao vírus da dengue, no ensaio de potência da vacina tetravalente da dengue (Dengvaxia®), como uma alternativa metodológica às células VERO. Os resultados do trabalho demonstraram que a linhagem HEK293T é menos sensível ao vírus vacinal que as células VERO, porém foi possível definir tanto a potência da vacina quanto a identidade do vírus. Além disso, foi possível observar uma diferença significativa entre a potência dos sorotipos vacinais, com uma dominância do sorotipo 4, o que não fora observado em células VERO. Dessa forma, a linhagem mostrou-se como uma boa candidata para ensaios de potencia vacinal de vacina tetravalente da dengue.

Palavras-chave: Dengue. Vacina Tetravalente. Potência. HEK293T.

ABSTRACT

Dengue disease is an arbovirus of great importance for global public health, affecting more than 100 countries and leaving more than 40% of the world's population at risk. In Brazil, until the epidemiological week 36 there were almost one million cases, with 484 deaths and the circulation of the four serotypes of the disease. In this context, the search for a tetravalent vaccine, for the four serotypes of the disease, effective against dengue virus (DENV) has become a global health priority. Several vaccines are under development in the world, however Dengvaxia®, produced by the Sanofi-Pasteur laboratory (France), is the first tetravalent vaccine to be registered in Brazil, and in another 20 countries in the world. In its clinical studies of phase I, II and III and post-registration, the vaccine showed efficacy against the four viral serotypes, however, an immunodominance of vaccine serotype 4 was observed over the others. In Brazil, according to the National Health Surveillance Agency (ANVISA), National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is responsible to guarantee the quality and release of each batch of vaccine consumed in the country, evaluating quality criteria such as potency, identity, thermostability, and others. The determination of the potency of Dengvaxia® is based on an infectious dose assay of 50% cell culture (50% CCID) from VERO cells. However, as defined by the World Health Organization (WHO), potency of tetravalent vaccines against dengue can be determined in VERO cells or others cells sensitive to the vaccine virus. Therefore, the present work seeks to evaluate the applicability of the HEK293T cell line, which has sensitivity to the dengue virus, in the potency test of the dengue tetravalent vaccine (Dengvaxia®), as a methodological alternative to VERO cells. The results of the work demonstrated that the HEK293T cells is less sensitive to the vaccine virus than VERO cells, however it was possible to define both the potency of the vaccine and the identity of the virus. In addition, it was possible to observe a significant difference between the potency of the vaccine serotypes, with a dominance of serotype 4, which was not observed in VERO cells. Thus, that cell line proved to be a good candidate for trials of vaccine potency of dengue tetravalent vaccine.

Keywords: Dengue. Tetravalent Vaccine. Potency. HEK293T.

LISTA DE SIGLAS

AC – Anticorpo

Ad5 – Adenovirus humano tipo 5 (HadV-5)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – Coleção Americana de Culturas de Células

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

CDC – Centro de Controle de Doenças (do inglês: *Center for Disease Control*)

Cels – Abreviação de “células”

CYD – Vírus vacinal quimérico da vacina tetravalente da dengue (do inglês: *Chimeric Yellow Fever/Dengue virus*)

DMEM – Meio Eagle Dulbecco Modificado (do inglês: *Dulbecco's modified Eagle's médium*)

DENV – Vírus da dengue (do inglês: *Dengue virus*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Proteína do envelope

FD – Febre da dengue

FHD – Febre hemorrágica da dengue

HEK 293 – Célula de rim embrionário humano (do inglês: *Human embryonic kidney 293 cells*)

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LM – Células mestre

LT – Células de trabalho

M – Proteína de membrana

MEM – Meio essencial mínimo (do inglês: *Minimum Essential Media*)

PBS – Tampão Fosfato Salino (do inglês: *Phosphate-buffered saline*)

prM – Proteína pré-membrana

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Reverse transcription-polymerase chain reaction*)

SCD – Síndrome de choque por dengue

SE – Semana epidemiológica

SFB – Soro fetal bovino

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

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

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

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Distribuição de dengue no mundo no ano de 2017 | 14 |
| Figura 2 - Distribuição dos casos notificados de dengue e proporções dos casos graves, por ano, Região das Américas, 1999 – 2020 (até Junho, 21 ^a semana epidemiológica) | 15 |
| Figura 3 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica, dos anos 2019 e 2020 (até a 36 ^a semana epidemiológica) | 16 |
| Figura 4 - Mapa ilustrando a circulação dos quatro sorotipos de dengue no Brasil, no ano de 2020 | 17 |
| Figura 5 - Classificação clínica dos casos de dengue de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2009) | 18 |
| Figura 6 - Preparação da diluição seriada em megaplaca | 36 |
| Figura 7 - Distribuição das diluições virais na microplaca | 37 |
| Figura 8 - Células HEK293T infectadas com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue durante três e sete dias de incubação, avaliado por imunocolorimetria..... | 42 |
| Figura 9 - Gráfico da potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID50, determinada em células HEK293T e VERO após 3 dias de incubação com o vírus vacinal..... | 44 |
| Figura 10 - Gráfico da potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID50, determinada em células HEK293T e VERO após 7 dias de incubação com o vírus vacinal..... | 45 |
| Figura 11 - Gráfico das potências médias, medida em \log_{10} CCID50, estimadas em células VERO após 3 e 7 dias de incubação com o vírus vacinal..... | 46 |
| Figura 12 - Gráfico das potências médias, medida em \log_{10} CCID50, estimadas em células HEK293T após 3 e 7 dias de incubação com o vírus vacinal..... | 46 |
| Figura 13 - Gráfico contendo as potências médias, medida em \log_{10} CCID50, de cada sorotipo do vírus vacinal para as células HEK293T e VERO após 3 dias de incubação..... | 48 |

Figura 14 - Gráfico contendo as potências médias, medida em \log_{10} CCID50, de cada sorotipo do vírus vacinal para as células HEK293T e VERO após 7 dias de incubação..... 49

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Vacinas Tetravalentes contra dengue | 21 |
|--|----|

SUMÁRIO

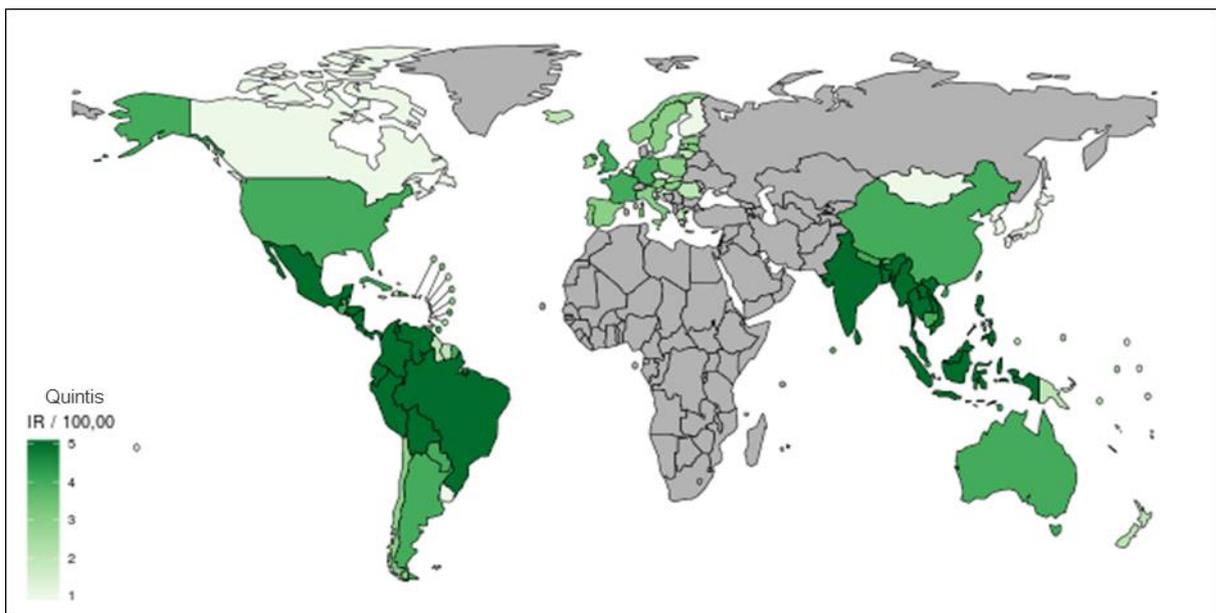
| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Vacinas..... | 19 |
| 1.1.1 | Vacinas da dengue..... | 20 |
| 1.2 | A vigilância sanitária e o controle da qualidade de vacinas..... | 23 |
| 1.2.1 | Ensaio de potência de vacinas | 24 |
| 1.2.2 | Uso de culturas de células em ensaios biológicos..... | 25 |
| 1.2.3 | Linhagem celular VERO | 26 |
| 1.2.4 | Linhagem celular HEK293T..... | 27 |
| 1.3 | Justificativa | 29 |
| 2 | OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 | Objetivo geral | 31 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 31 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 | Amostras de vacinas | 32 |
| 3.2 | Cultura de células..... | 32 |
| 3.2.1 | Manutenção das linhagens celulares..... | 32 |
| 3.2.2 | Preparo e fornecimento de células | 34 |
| 3.3 | Determinação do título da infecção e identidade da vacina tetravalente contra a dengue em células VERO..... | 34 |
| 3.3.1 | Preparação da diluição seriada | 35 |
| 3.3.2 | Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas | 36 |
| 3.3.3 | Fixação das células com acetona e coloração | 37 |
| 3.4 | Determinação da infectividade e identidade da vacina contra a dengue para a linhagem celular HEK293T..... | 38 |
| 3.5 | Determinação da curva de titulação da infecção e identidade vacinal para células HEK293T | 39 |
| 3.6 | Análise estatística..... | 39 |
| 4 | Resultados e Discussão | 41 |
| 4.1 | Avaliação da sensibilidade das células HEK293T à infecção pelo vírus | |

| | | |
|----------|---|-----------|
| | vacinal da dengue após exposição de 3 e 7 dias..... | 41 |
| 4.2 | Determinação da potência e da identidade de vacina tetravalente para a dengue utilizando células HEK293T e VERO | 43 |
| 4.3 | Avaliação da potência para os diferentes sorotipos do vírus vacinal de vacina tetravalente da dengue em células HEK293T | 47 |
| 5 | Conclusão | 51 |

1 INTRODUÇÃO

A dengue, uma arbovirose predominantemente de zonas tropicais e regiões subtropicais, constitui importante problema e desafio à saúde pública, com mais de 40% da população mundial sob risco de acometimento da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020; BRADY et al., 2012). De fato, a doença é endêmica em mais de 100 países (Figura 1) e mais de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção (ZELLWEGER et al., 2013; VILLAR et al., 2015). Segundo estimativas e modelos epidemiológicos, 390 milhões de casos de infecção pelo vírus da dengue (DENV) ocorrem anualmente, com aproximadamente 96 milhões de indivíduos sintomáticos, com algum grau de severidade clínica (BHATT et al., 2013).

Figura 1 - Distribuição de dengue no mundo no ano de 2017

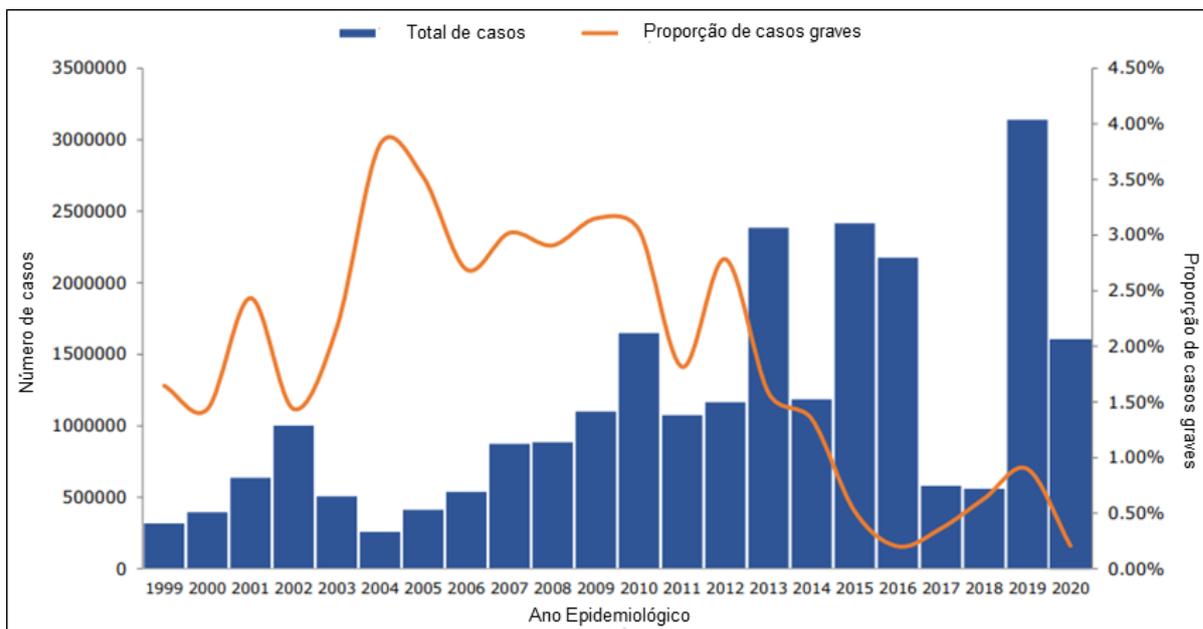


Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a.

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 acredita-se estar associado com a simultaneidade da pandemia da COVID-19 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020a).

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 2), 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, 2020a). Esses dados, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (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, 2020a).

Figura 2 - Distribuição dos casos notificados de dengue e proporções dos casos graves, por ano, Região das Américas, 1999 – 2020 (até Junho, 21^a semana epidemiológica)

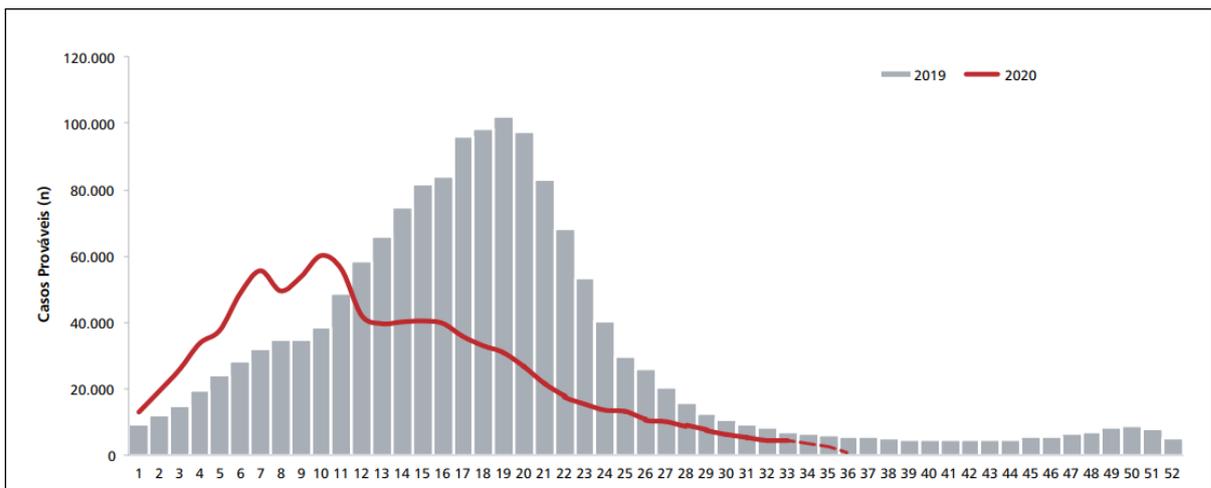


Fonte: ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, jun. 2020b.

No Brasil, em 2020, até a semana epidemiológica (SE) 36, foram notificados 928.282 casos prováveis de dengue, com uma taxa de incidência de 441,7 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2020). Como ilustrado pela Figura 3, a curva de casos prováveis de dengue notificados até a SE 11 de 2020 é superior à do ano de 2019, no entanto, a partir da SE 12, quando inicia-se, 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, 2020).

Figura 3 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica, dos anos 2019 e 2020 (até a 36ª semana epidemiológica)

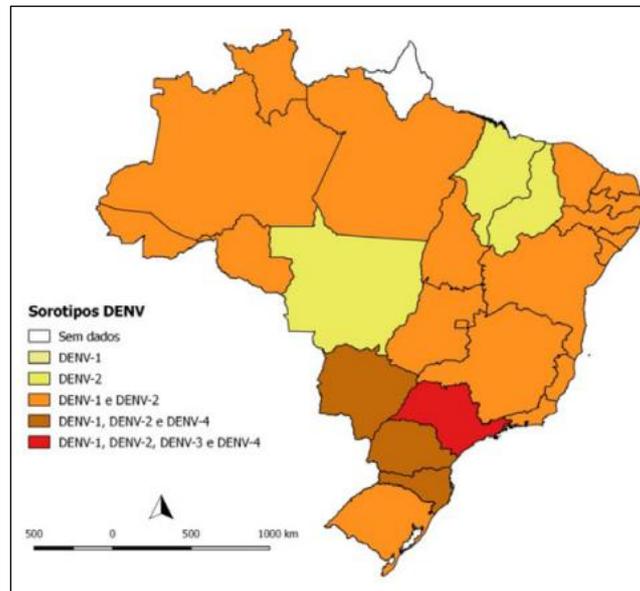


Nota: Dados referentes a SE 36.

Fonte: BRASIL, 2020.

Quanto ao número de casos graves e óbitos reportados em 2020, até a semana epidemiológica 36, foram 756 casos de dengue grave (DG) e 8.679 casos de dengue com sinais de alarme (DSA), com 484 casos de óbitos em decorrência da doença. Assim como os dados de casos totais de dengue, os números de casos confirmados de dengue grave e de óbitos apresentam redução a partir da SE 10, quando comparados aos números consolidados de 2019, o que pode estar, também, relacionado à pandemia da COVID-19 (BRASIL, 2020). Por fim, como demonstrado na Figura 4, o Brasil apresenta a circulação dos quatro sorotipos do DENV, os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BRASIL, 2020).

Figura 4 - Mapa ilustrando a circulação dos quatro sorotipos de dengue no Brasil, no ano de 2020



Nota: Atualizado em 08/09/2020.
Fonte: Modificado de BRASIL, 2020.

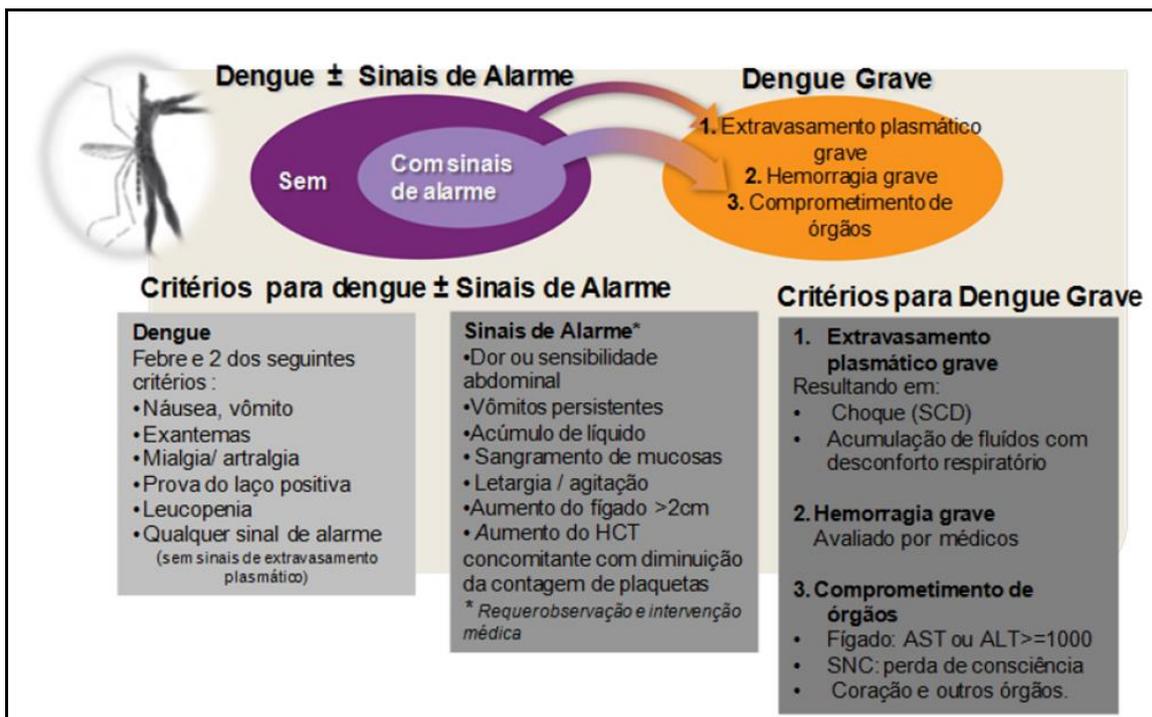
O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* de pequenos vírus envelopados, e possui quatro sorotipos distintos circulantes, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (ROTHMAN, 2004). Como os demais membros do gênero *Flavivirus*, os vírions são esféricos, com aproximadamente 50nm de diâmetro, e possuem genoma composto por RNA de fita simples e polaridade positiva (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015, HALSTED, 1988).

A doença causada pelo vírus (dengue) apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que podem variar de acordo com a gravidade e a idade dos pacientes infectados. Os quadros clínicos incluem desde a infecção assintomática e/ou branda até a síndrome de choque por dengue (SCD) (SAN MARTIN, 2010, SCHWARTZ et al., 2015). A infecção pode ser causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais podendo resultar na forma assintomática, na forma leve, definida como febre da dengue (FD), ou nas formas mais graves da doença, febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque por dengue (SCD) (HADINEGORO, 2012). Em geral, os quadros de dengue se iniciam de quatro a oito dias após a infecção e duram em torno de dois a sete dias (GUZMAN e HARRIS, 2015). Nos casos mais graves, FHD e SCD, há risco significativo de morbidades e de mortalidade (LAM, 2013).

Para facilitar a identificação e o manejo clínico dos pacientes, além da notificação da doença, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1997, categorizou as diferentes formas clínicas da dengue especificando as manifestações clínicas associadas, além disso, estratificou a forma grave da doença (FHD) em quatro graus de acordo com a gravidade, sendo os graus III e IV representativos da SCD (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997).

Contudo, o protocolo de identificação definido suscitou interpretações diversas e não facilitou, como se desejava, o manejo clínico dos pacientes acometidos pelas diversas formas da dengue (BALMASEDA et al., 2005). Dessa forma, objetivando a melhoria nos processos de triagem, classificação clínica, tratamento e diagnóstico precoce, a OMS, em 2009, sugeriu uma nova classificação para os casos de dengue (TSAI, 2013). Os novos critérios classificavam a dengue em duas categorias, que vão variando conforme os níveis de gravidade: 1ª - dengue, com ou sem sinais de alertas; 2ª - dengue severa (Figura 5) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). De fato, a nova classificação resultou em maior sensibilidade na identificação dos casos, principalmente dos mais graves (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Figura 5 - Classificação clínica dos casos de dengue de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2009).



Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009.

Tendo em vista o crescimento e/ou a manutenção de elevadas taxas de incidência da doença, em conjunto com seu amplo alcance geográfico e a gravidade das suas formas clínicas, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o agente etiológico da dengue tem sido, cada vez mais, considerado como uma prioridade para a saúde pública e comunitária mundial (REITER, 2010). Atualmente, algumas vacinas desenvolvidas já avançam no processo de liberação, sendo que no Brasil já há a liberação para uma vacina heteróloga produzida pela Sanofi-Pasteur, a vacina tetravalente de vírus quiméricos atenuado, Dengvaxia® (CYD-TDV) (VILLAR et al., 2015).

1.1 Vacinas

Vacinas tratam-se de complexos produtos farmacêuticos e cada uma 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; SINGHE; MEHTA, 2016).

A complexidade e diversidade de cada novo produto apresenta 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 (SINGHE; 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. 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* realizados antes e durante o desenvolvimento clínico de vacinas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

Já 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, 2017b). 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 (SINGHE; MEHTA, 2016).

No contexto da dengue, a infecção primária com DENV leva à indução de anticorpos neutralizantes de longa duração, com uma imunidade duradoura contra a doença após nova infecção com o mesmo sorotipo (imunidade homotípica) (LAOPRASOPWATTANA et al., 2007). Contudo, em infecções secundárias, onde o indivíduo é infectado por um sorotipo heterólogo ao da infecção primária, há um aumento expressivo no risco de desenvolvimento de quadros graves da doença. A preocupação com essas manifestações graves, mais comuns em infecções secundárias, favorece a necessidade do desenvolvimento de vacinas tetravalente contra dengue que estimulem a resposta imune equilibrada para os quatro sorotipos (GUZMAN e HARRIS, 2015). Assim, a vacina ideal contra dengue deve proteger para cada um dos quatro sorotipos da DENV, fornecer proteção de longa duração, sua imunização deve ser segura e bem tolerada, não induzir os fenômenos de agravamento da doença e ter um baixo custo, proporcionando ampla acessibilidade da população à vacinação (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

1.1.1 Vacinas da dengue

Existe um grande número de vacinas tetravalente contra a dengue sendo desenvolvidas no mundo e utilizando as mais diversas tecnologias de imunização, como: vírus atenuado, vírus inativado, proteínas recombinantes, DNA, entre outras (Tabela 1). Dentre essas, destacam-se três vacinas pelo avançado estágio de desenvolvimento, as vacinas TV003/TV005 (do Instituto Butantan - Brasil), a DENVax (do laboratório Takeda - Japão) e a Dengvaxia® (do laboratório Sanofi-Pasteur - França), essa última com as etapas de registro já concluídas (THOMAS, 2014, CDC, 2015).

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 | Vivo 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 | Vivo atenuado | Mutações genéticas com cepas selvagem | III |
| TDENV PIV | GSK e Walter Reed Army Institute of Research | Vírus inativado purificado | Inativação por formalina | 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 são expressas sob o controle do promotor-potencializador do citomegalovírus humano do VR1012 vetor de plasmídeo | I |

Fonte: DVI, 2016.

De fato, em 2015, a vacina tetravalente produzida pela Sanofi-Pasteur (Dengvaxia® - CYD-TDV) obteve o registro no Brasil, tornando-se a primeira vacina tetravalente contra a dengue registrada no país. Essa vacina também foi aprovada por outras agências em vinte países distribuídos pela Ásia e América Latina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

A Dengvaxia® é uma vacina tetravalente contra a dengue que contém vírus atenuado quiméricos cujo arcabouço viral é derivado da cepa da vacina 17D contra

a febre amarela (YF17D) (VILLAR et al., 2015). Assim, cada vírus que compõe a vacina foi construído através da substituição dos genes que codificam as proteínas do envelope (E) e da pré-membrana (prM) do vírus da vacina de febre amarela (YF17D) pelos genes dos quatro diferentes sorotipos de vírus da dengue (GUY et al, 2011; SCHWARTZ et al., 2015).

A Dengvaxia® se mostrou eficaz e segura na prevenção da doença durante os ensaios clínicos de fase I, II, e III realizados com voluntários entre dois a sessenta anos de idade na Ásia e na América Latina. Ainda, durante os estudos, apenas reações leves foram relatadas, como dores no local de aplicação, dores de cabeça e leve mal-estar, sem ter sido observado nenhum evento adverso grave relacionado à vacina, como reações anafiláticas, eventos neurotrópicos ou viscerotrópicos (GAILHARDOU et al., 2016).

Contudo, durante o *follow-up* desse voluntários, foi observado, no terceiro ano de acompanhamento, um aumento no risco de hospitalizações por dengue no grupo de crianças com idade inferior a nove anos vacinadas com a Dengvaxia® (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Diante desta circunstância, após relatado o aumento no risco, sugeriu-se que a vacina, para essa faixa etária, induziria uma primo-infecção pelo vírus da dengue, proporcionando uma proteção de curto prazo após a administração da vacina, com a perda de imunidade protetora ao longo do tempo (GAILHARDOU, 2016).

Já para a população acima de nove anos de idade, a vacina apresentou eficácia geral de 65,6% para pessoas que nunca tiveram dengue (soronegativas), uma redução de 80,3% no risco de hospitalização e de 93% para os casos graves da doença. Quando estratificados os resultados por sorotipo, as eficácias apresentadas foram de 58,4% contra o sorotipo 1 (DENV-1), 47,1% contra o sorotipo 2 (DENV-2), 73,6% contra o sorotipo 3 (DENV-3) e de 83,2% contra o sorotipo 4 (DENV-4) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015; HADINEGORO et al., 2015).

Em 2017, a Sanofi-Pasteur apresentou os resultados finais dos estudos de *follow-up*, após cinco anos da administração da vacina, demonstrando que a vacinação com a Dengvaxia® resultou em benefícios para a população geral do estudo, principalmente nos indivíduos que, ao início do estudo, eram soropositivos para dengue. No entanto, para indivíduos soronegativos, os resultados demonstraram que, após 30 meses, ocorreu um aumento no risco de

hospitalizações e agravamento da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Diante desses dados, a vacinação com a Dengvaxia® passou a ser recomendada, tanto pela OMS quanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apenas para indivíduos soropositivos, excluindo da recomendação os indivíduos que não tenham sido previamente infectados pelo vírus da dengue (soronegativos) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A Dengvaxia® (uma dose – 0,5 mL) é composta por um pó liofilizado injetável e solução diluente de cloreto de sódio 0,9%, contendo, após sua reconstituição, o valor de potência de 4,5 – 6,0 \log_{10} DICC₅₀/dose para os quatro sorotipos. O esquema vacinal é de três doses, sendo a aplicação da segunda e da terceira dose realizada após 6 e 12 meses respectivamente. Seu uso é recomendado para indivíduos entre 9 e 45 anos de idade que vivam em áreas endêmicas, sendo contraindicado para gestantes, indivíduos imunocomprometidos e indivíduos soronegativos (DVI, 2015; VANNICE, 2016; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

1.2 A vigilância sanitária e o controle da qualidade de vacinas

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). O controle da qualidade refere-se às ações relacionadas com a medição da qualidade de um produto ou serviço, a fim de avaliar se os requisitos estão sendo respeitados para a finalidade a que se destina. 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).

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

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).

Assim, cada lote de vacina é submetido à análise no INCQS, que, através de ensaios analíticos, avalia a eficácia (ensaios de identidade, estabilidade e potência) e segurança (testes de esterilidade, toxicidade e pirogênio ou endotoxina bacteriana), segundo critérios padronizados estabelecidos pela OMS e órgãos reguladores, das vacinas a serem utilizadas no país (BRASIL, 2008).

1.2.1 Ensaios de potência de vacinas

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, resulta em 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).

A potência de uma vacina que utiliza agentes vivos ou atenuados é geralmente expressa em termos de unidades infecciosas (em vacinas virais, unidades virais infecciosas) contidas em uma dose, determinada em substratos biológicos específicos (como cultura de células sensíveis), e baseada nos resultados dos ensaios clínicos de fase I e fase II (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). 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 de vacinas virais, tais como pela reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (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 e redução de plaque (PRNT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007), unidades formadoras de placas (UFP) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007), imunofocos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013), teste de dose infectante de 50% da cultura de células (CCID₅₀), entre outros (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

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 tipos de vírus presentes na vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Ainda, o método utilizado nos ensaios de potência pode também definir a identidade da vacina, se for capaz de identificar a presença de cada sorotipo do DENV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

De fato, a potência da Dengvaxia® é avaliada através de ensaio que verifica a presença ou ausência de infectividade em culturas celulares, em decorrência de alterações imunocolorimétricas ocasionadas pela presença do vírus específico para cada sorotipo, sendo o título viral expresso em log₁₀ CCID₅₀ 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, GUY, et al., 2011).

Apesar disso, a metodologia para ensaios biológicos da vacina tetravalente da dengue ainda não está estabelecida em monografias farmacopéicas, sendo válida a procura por novos métodos e alternativas metodológicas para definir a potência dessas vacinas, um importante parâmetro da qualidade desses produtos biológicos.

1.2.2 Uso de culturas de células em ensaios biológicos

A técnica de cultura celular é caracterizada pela manutenção de células vivas em laboratório, organizadas e acopladas em recipientes estéreis, permitindo assim a extensão da técnica de cultura em tecido. Dentre as diversas aplicabilidades da técnica de cultura de células está a possibilidade de realização de ensaios de potência e citotoxicidade de vacinas utilizando esses substratos biológicos (MIGITA, 2012).

A técnica de cultura adquiriu grande destaque e eficiência no âmbito de pesquisas biomédicas e biotecnológica, favorecendo respostas simplificadas para

investigações biomédicas e científicas complexas, uma vez que são modelos biológicos mais simples e de fácil manutenção quando comparados a animais de experimentação (MIGITA, 2012).

Diversas são as aplicações para a técnica de cultivo, como estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, utilização na obtenção de partículas virais, no diagnóstico de doenças, análise de alvos farmacológicos, produção de produtos biológicos, e, também, na produção de imunobiológicos, vacinas e anticorpos monoclonais (FRESHNEY, 2006; MIGITA, 2012).

O emprego de culturas celulares em ensaios biológicos requer conhecimento prévio das linhagens utilizadas. As células devem ser cultivadas sobre condições específicas, apropriadas, com critérios definidos, reprodutíveis e padronizados, a fim de garantir perfeitas condições e adequabilidade para o determinado ensaio a que se propõe realizar (KASVI, 2017). Dessa forma, é fundamental que o laboratório tenha conhecimento aprofundado das linhagens celulares que utiliza, disponha de protocolos e procedimentos padrões de cultivo que atendam às necessidades de cada ensaio a que destinam-se as células e, por fim, disponha de corpo técnico especializado.

Nesse contexto, o Setor de Cultura de Células do INCQS enquadra-se como um laboratório apropriado para o cultivo de células para fins analíticos, com grande *expertise* no manejo de linhagens celulares. De fato, o banco tem em seu acervo um grande número 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), com cada linhagem certificada e autenticada. Além disso, tem bem estabelecido um conjunto de protocolos e procedimentos padronizados para o cultivo de células, manutenção da esterilidade, controle da qualidade dos processos de cultivo e analíticos, entre outros, que estão em constante desenvolvimento e atualização por seu corpo técnico especializado.

1.2.3 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 et al., 1964), rubéola (RHIM; SCHELL, 1967, LIEBHABER et al., 1967), arboviroses (SIMIZU et al., 1967; RHIM et al., 1969), caxumba (RHIM et al., 1969) e adenovírus (RHIM et al., 1969), em decorrência, acredita-se, de uma ausência na produção de interferons do tipo 1 em resposta às infecções virais (DESMYTER et al., 1968).

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 uso em 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 utilizadas 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., 2020). De fato, a vacina tetravalente contra a dengue baseada em vírus atenuados quiméricos, Dengvaxia® (CYD-TDV), tem sua produção e testagem em células VERO (LECOUTURIER et al., 2019).

1.2.4 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 mesmo após atingida a confluência, ou seja, sem apresentar estímulo de parada por contato célula-célula (inibição de contato), 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 e 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 transfecções, 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 à infecções pelo DENV, para os mais diversos sorotipos, assim como para outros membros da família *Flaviviridae* (JITOBOAM et al., 2016; RATTANACHUEN et al., 2011; RUNGRUENGPOL 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 et al., 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).

Dessa forma, a linhagem celular HEK293T pode configurar-se como uma promissora alternativa nos estudos envolvendo a infectividade da vacina tetravalente da dengue, como a Dengvaxia®, sendo futuramente utilizada em ensaios para determinação da potência dessas vacinas.

1.3 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 da DENV. Uma resposta imune desbalanceada pode resultar em níveis sub-ótimos de anticorpos contra um dos sorotipos, podendo ocasionar o agravamento do quadro clínico de pacientes infectados pelo sorotipo não contemplado (THOMAS, 2014).

Assim, uma vacina que induza níveis sub-protetores de anticorpos anti-DENV não é somente ineficiente, como, também, potencialmente danosa, ao aumentar o risco de casos graves de dengue após nova infecção. Além disso, é importante que após o estabelecimento de uma resposta humoral protetora, os níveis de anticorpos gerados mantenham-se em concentrações adequadas por um longo período após a vacinação (ZELLWEGER et al., 2013).

Nesse contexto, os testes de controle de qualidade preconizados, como identidade, potência e termoestabilidade, são essenciais para garantir a eficácia da vacina tetravalente da dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Assim, para a determinação da potência de vacinas tetravalente atenuadas recomenda-se, segundo critérios da OMS, o uso de ensaios de titulação viral por plaque, CCID₅₀ ou imunofocus em cultura de células VERO ou outras células sensíveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

Segundo a OMS, primatas não humanos são modelos preditivos adequados para mensurar e prever níveis de viremia e anticorpos para DENV por infecção natural ou por vacinação, embora a fisiopatologia da doença nesses animais apresente diferença em relação aos humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Em ensaios com células VERO foi demonstrado que a vacina Dengvaxia® resultou em títulos virais e de anticorpos balanceados para os quatro sorotipos virais do DENV (POO et al., 2011; MORRISON et al., 2010; CAPEDING et al., 2011; TRAN et al., 2012; LECOUTURIER et al., 2019). Contudo, em estudos com crianças soronegativas para o DENV, observou-se que a Dengvaxia® apresentava baixa eficácia e aumentava o risco de complicações clínicas após a exposição e infecção ao vírus da dengue. Essa baixa performance da vacina, segundo os estudos de imunogenicidade, estava associada a um desbalanço nos títulos virais e de anticorpos produzidos, com uma forte dominância do sorotipo 4

(DENV-4) sobre os demais sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) (HENEIN et al., 2017; GUY, 2009; VILLAR et al., 2015; CAPEDING et al., 2014), o que demonstra uma possível falha dos modelos preditivos utilizados.

Nesse contexto, levando em consideração as diferenças fisiopatológicas interespecíficas do DENV, entre humanos e primatas não humanos, e a possível falha dos modelos preditivos com células animais, foi considerado necessária a investigação de modelos que aproximam-se da realidade humana.

Nesse ponto, foi idealizado e elaborado o projeto de pesquisa intitulado “Estudo da infectividade da vacina tetravalente da Dengue em diferentes linhagens celulares e sua aplicabilidade em um ensaio de potência”, na forma de doutorado acadêmico da Msc. e Pesquisadora Renata Faria de Carvalho, sob orientação da Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, que visa avaliar os efeitos do vírus vacinal da Dengue em diferentes linhagens celulares e como esses efeitos se comportam ou alteram ensaios de potência vacinal.

Dentro desse projeto, como uma das linhas de estudo, o presente trabalho busca investigar uma das linhagens estudadas, a linhagem celular HEK293T, que, por suas características, mostrou-se uma promissora candidata para os estudos.

Com isso, a proposta do estudo é avaliar a aplicabilidade da linhagem celular HEK293T como alternativa à linhagem celular VERO em ensaios de potência da vacina tetravalente da dengue, buscando desenvolver uma metodologia alternativa à clássica, que demonstre maior exatidão, sensibilidade, e que seja mais fisiologicamente próxima a realidade humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a linhagem celular HEK293T como alternativa metodológica à linhagem celular VERO no ensaio de potência da vacina tetravalente contra a dengue.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a infectividade do vírus vacinal da vacina tetravalente contra dengue em células da linhagem celular HEK293T;
- Avaliar se as células HEK293T são capazes de determinar a identidade vacinal da vacina tetravalente contra a dengue em imunoenensaio;
- Determinar a potência da vacina tetravalente da dengue em ensaio utilizando células HEK293T e VERO;
- Comparar os resultados obtidos na linhagem celular HEK293T com a metodologia convencional (VERO).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de vacinas

Amostras de vacina tetravalente da dengue, Dengvaxia®, produzidas pelo produtor Sanofi Pasteur, foram armazenadas e mantidas de 2 a 8 °C, conforme orientação da bula. Foi selecionado para realização dos ensaios desse estudo um único lote da vacina Dengvaxia®.

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

3.2 Cultura de células

Para os ensaios realizados, foram utilizadas duas linhagens celulares comerciais: VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano) e HEK293T (células de rim embrionário humano).

3.2.1 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 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 nos ensaios, resultantes do descongelamento e manutenção das ampolas dos LT, encontravam-se entre as passagens 142 e 150, sendo esta uma obrigatoriedade estabelecida pelo produtor para o controle de qualidade dos ensaios.

As células VERO foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM, Gibco/ Life Technologies) com 5% Soro Fetal Bovino (SFB) (HyClone/ Thermo Scientific), suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco/ Life Technologies), 26 mM NaHCO₃ (Eurobio Ingen), 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 (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 Scientific). Após a lavagem foi adicionada solução de Tripsina Versane EDTA (Lonza) 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.

HEK293T:

A linhagem celular HEK293T foi cedida, gentilmente, pelo Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, 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 mestre (LM), que são usados para a produção de lotes 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 instituída 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/ Thermo Scientific), suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco/ Life Technologies), 26mM NaHCO_3 (Eurobio Ingen), 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dihidrostreptomomicina (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), 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 (Eurobio Scientific). 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, e, então, a suspensão

celular foi centrifugada por cinco minutos a 1000rpm (Centra MP4R, IEC) para precipitação do conteúdo celular.

O sobrenadante foi descartado e o conteúdo celular foi ressuspendido 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 da suspensão celular, na diluição definida, acrescida de meio de cultura fresco (DMEM 10% SFB – suplementado) suficiente para a área de superfície de cultivo da garrafa.

3.2.2 Preparo e fornecimento de células

As suspensões celulares foram preparadas e fornecidas sempre no dia da realização dos ensaios. 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-dihidrostreptomicina, e concentração celular de $3 \times 10^5 \pm 10\%$ células/ mL em volume necessário para a realização do ensaio.

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 dihidrostreptomicina, com concentração celular de $3 \times 10^5 \pm 10\%$ células/ mL em volume necessário para a realização do ensaio.

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 2-3 dias para as células VERO e 3-4 para as células HEK293T).

3.3 Determinação do título da infecção e identidade da vacina tetravalente contra a dengue em células VERO

Para a realização do ensaio, foi utilizada uma microplaca de 96 poços para cada sorotipo, totalizando quatro microplacas por ensaio. Cada microplaca foi identificada com a data do ensaio, nome do operador e sorotipo a ser titulado. Para cada sorotipo foi designado uma cor diferente (preta, azul, vermelha e verde, para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 respectivamente).

Posteriormente, foram distribuídos 100 μL da suspensão celular previamente preparada na concentração de $3 \times 10^5 \pm 10\%$ células/mL em meio MEM 10% de SFB nas microplacas de 96 poços da coluna 1 a 12, deixando a coluna 11 da placa vazia. Em seguida, distribuiu-se 100 μL de meio de cultura MEM 10% SFB suplementado com 2% HEPES (GIBCO, Invitrogen Corporation) previamente preparado nos poços da última coluna, destinados ao controle negativo das células.

As placas foram incubadas na estufa a uma temperatura de $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$, até o momento da distribuição das diluições virais.

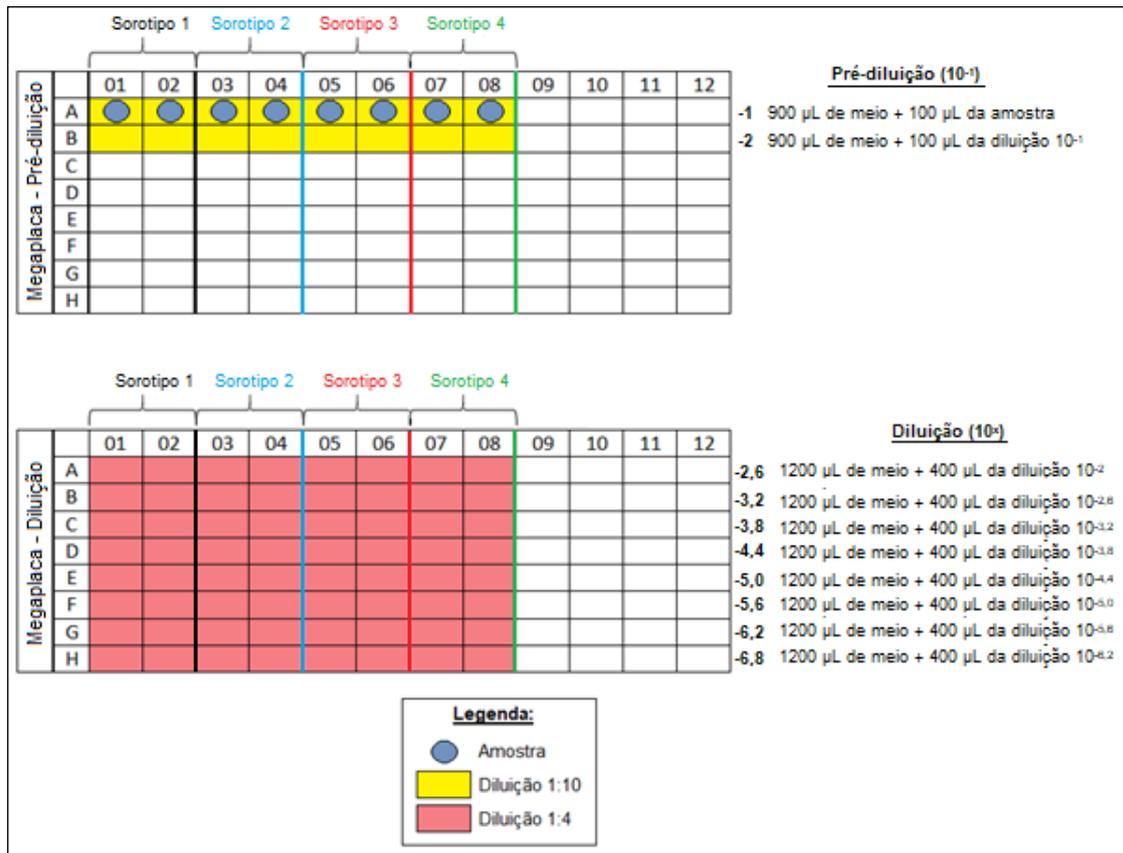
3.3.1 Preparação da diluição seriada

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

Foram realizadas duas pré-diluições, conforme apresentado na Figura 6: A primeira, de 10^{-1} , na qual foram adicionados 100 μL da vacina reconstituída em 900 μL de meio de diluição, seguida de homogeneização cinco vezes com 800 μL ; e a segunda, de 10^{-2} , em que foram adicionados 100 μL da diluição de 10^{-1} em 900 μL de meio de diluição, seguida de homogeneização novamente.

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

Figura 6 - Preparação da diluição seriada em megaplaca



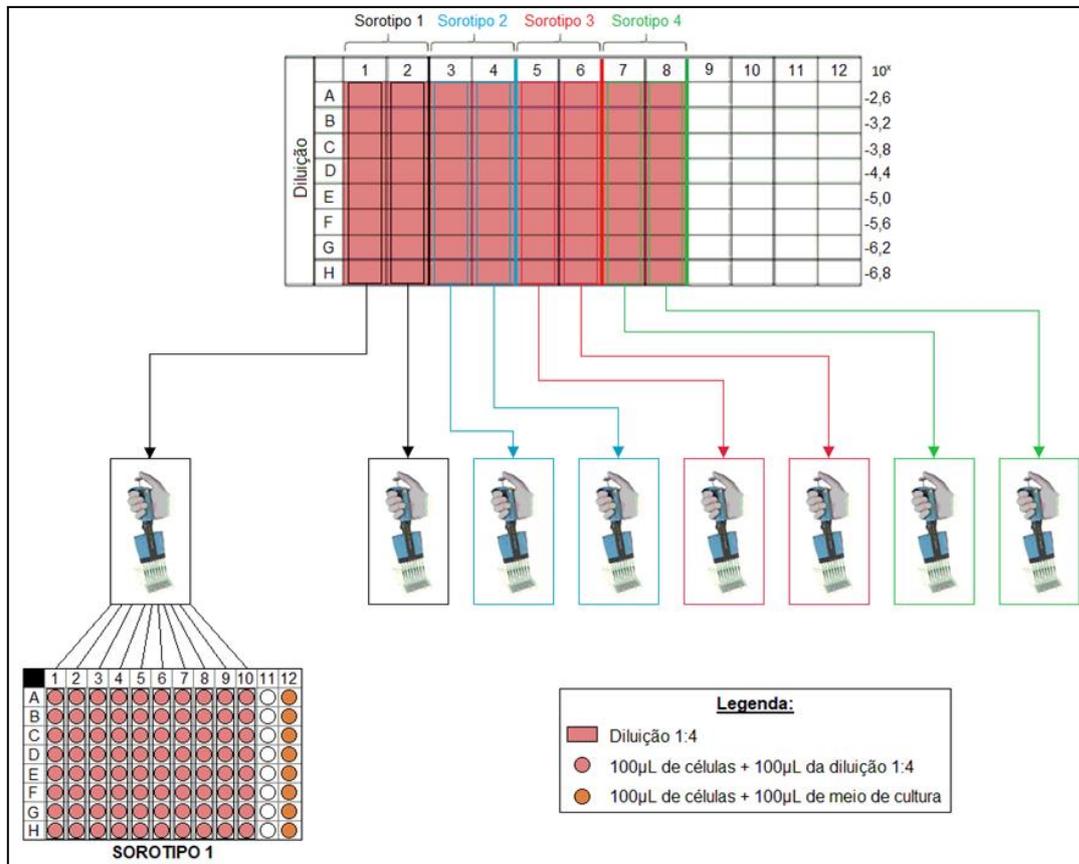
Fonte: O autor, 2021.

3.3.2 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 7. 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 tampadas e incubadas na estufa a 36 ± 1 °C, $5\% \pm 1\%$ CO₂ por três e sete dias.

Figura 7 - Distribuição das diluições virais na microplaca



Fonte: O autor, 2021.

3.3.3 Fixação das células com acetona e coloração

Após a incubação, as microplacas foram examinadas ao microscópio ótico invertido e o meio da placa foi retirado. As células foram fixadas com aproximadamente 250µL de acetona 85% (v/v) fria e incubadas a temperaturas iguais ou inferiores a -20 °C por 15 minutos. Em seguida, toda a acetona foi removida e as placas foram postas em papel absorvente para retirada de resquício. As placas, então, foram dispostas em cabine de segurança com fluxo laminar para completa secura dos poços, por cerca de 30 minutos, a fim de evitar o desprendimento das monocamadas de célula.

Após a secagem total dos poços, foram distribuídos 100 µL do tampão de saturação (PBS com 3% de *skimmilk* + 0,1% de Triton X-100 + 0,1% Tween-20) em cada poço da placa e incubadas por 30 minutos a 36 °C ± 1 °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 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 + 0,1% Tween-20). 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 ligado à fosfatase alcalina – na diluição de 1:1000 em tampão de saturação – em cada poço, seguido por incubação durante 45 minutos a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 por inversão em papel absorvente. Foram distribuídos 50 μL do substrato da fosfatase alcalina (NBT/BCIP) e as placas foram incubadas protegidas da luz, 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 ótico invertido, com 100x de aumento, quanto à presença ou ausência de coloração em cada uma das diluições. A determinação do CCID₅₀ foi estabelecida em cada microplaca de 96 poços, na qual foram contados os números de poços positivos por diluição. Os poços que apresentaram coloração arroxeadada 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.

3.4 Determinação da infectividade e identidade da vacina contra a dengue para a linhagem celular HEK293T

Durante a infecção das células, as proteínas virais (proteínas do envelope) foram visualizadas utilizando o 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. Foi realizada a infecção das células com incubação de um, três e sete dias.

Para isso, a suspensão celular HEK293T foi distribuída, em placa de 96 poços, na concentração de 3×10^5 cels/mL em meio DMEM 10% de SFB. Após esse procedimento, a linhagem celular foi infectada com a vacina tetravalente da dengue nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2.6}$. Para a preparação da diluição seriada, foi utilizado o meio DMEM 10% SFB para a célula HEK293T. Células VERO foram utilizadas como controle de infecção. Em seguida, as microplacas foram tampadas e incubadas na estufa a 36 ± 1 °C, $5\% \pm 1\%$ CO₂ 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 3.3.3.

3.5 Determinação da curva de titulação da infecção e identidade vacinal para células HEK293T

Foram distribuídos 100µL de suspensão de células HEK293T contendo 3×10^5 cels/mL em meio DMEM 10% de SFB em todos os poços da microplaca de 96 poços (Nunc), 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 $10^{-3.4}$), tampadas e incubadas na estufa a 36 ± 1 °C, $5\% \pm 1\%$ CO₂ 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 3.3.3.

3.6 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 agrupados das potências estimadas tanto das células HEK293T quanto das células VERO, que cumpriam distribuição normal, tanto para 3 dias (n=16 e n=8, respectivamente) quanto para 7 dias (n=16), foi realizado o teste t de Student, não pareado.

Para os resultados de potência por sorotipo, tanto para as células HEK293T quanto para as células VERO, cujas distribuições não eram normais, foram realizados o teste de *Two-way* ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, tanto para 3 dias (n=4 e n=2, respectivamente) quanto para 7 dias (n=4). Com a confirmação dos resultados estatísticos obtidos através da realização do teste de Kruskal-Wallis, para analisar a diferença entre os grupos (células) e de Mann Whitney, para analisar a diferença entre os sorotipos. Foi adotado como nível de significância o p-valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da sensibilidade das células HEK293T à infecção pelo vírus vacinal da dengue após exposição de 3 e 7 dias

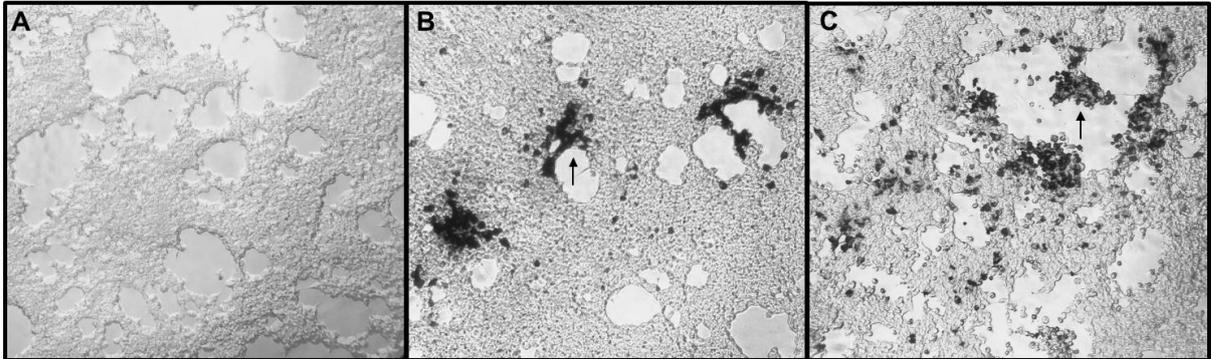
A fim de determinar a infectividade da vacina tetravalente da dengue, com vírus quimérico atenuado, nas células HEK293T, foram realizados ensaios (n=2) de infectividade para três diluições vacinais, 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$, para um, três e sete dias de incubação. Duas das diluições escolhidas 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. Dessa forma, utilizando as duas diluições vacinais mais concentradas e uma terceira equivalente, seria possível determinar se a linhagem celular HEK293T era sensível ao vírus vacinal e se tal sensibilidade era próxima ou não à da linhagem VERO. Células VERO foram utilizadas como controle de infecção para as diluições e tempos investigados.

Para o tempo de 24 horas (um dia), não foi observada a presença de infecção nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e $10^{-2,6}$ em nenhuma das células avaliadas (HEK293T e VERO), apontando que o tempo de 24 horas seria insuficiente para o estabelecimento de infecção viral detectável pelo método analítico utilizado, ensaio de imunocolorimetria.

Para o tempo de três dias, foi observada a presença de infecção viral nas concentrações 10^{-1} (Figura 8) e 10^{-2} (dados não mostrados) nas células HEK293T. As células VERO mostraram-se positivas para todas as concentrações testadas (dados não mostrados). Esse resultado demonstrou que a linhagem apresentava sensibilidade ao vírus vacinal no tempo investigado, contudo, aparentemente, com menor susceptibilidade, ou seja, permissibilidade ao vírus, que as células VERO.

Por fim, no tempo de sete dias de incubação com o vírus vacinal, também foi observada a presença de infecção viral nas concentrações 10^{-1} (Figura 8) e 10^{-2} (dados não mostrados) em células HEK293T. Para o mesmo período, as células VERO (controle positivo) mostraram-se positivas para todas as concentrações testadas (dados não mostrados). Os achados reforçaram os resultados encontrados para o tempo de três dias, demonstrando que a linhagem celular HEK293T apresenta sensibilidade à infecção pelo vírus vacinal de vacina tetravalente contra a dengue, contudo, com menor permissibilidade que a linhagem celular VERO.

Figura 8 - Células HEK293T infectadas com o sorotipo 2 do vírus vacinal da dengue durante três e sete dias de incubação, avaliado por imunocolorimetria



Legenda: Células HEK293T sem infecção – controle celular (A). Células HEK293T infectadas com o vírus vacinal para o sorotipo 2, na diluição 10^{-1} , durante três dias de incubação (B). Células HEK293T infectadas com o vírus vacinal para o sorotipo 2, na diluição 10^{-1} , durante sete dias de incubação (C). As setas em preto destacam a infectividade viral. Imagens representativas obtidas com microscópio Nikon, aumento 100X.

Fonte: O autor, 2020.

Todos os ensaios de avaliação da infectividade, ou sensibilidade celular à infecção viral, da vacina sobre células HEK293T foram realizados analisando o sorotipo 2 (CYD-2) para análise da infecção. 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 celular da linhagem HEK293T à vacina estaria sendo submetida à pior condição, assim, caso o resultado se mostrasse positivo, esperava-se que os demais sorotipos provavelmente também apresentariam a mesma positividade.

Testes de controle da qualidade como identidade, potência e termoestabilidade, são essenciais para garantir a eficácia da vacina tetravalente da dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Ainda, segundo a OMS, a determinação da potência de vacinas tetravalente atenuadas pode ser realizada através de ensaios de titulação viral por plaque, $CCID_{50}$ ou imunofocus em cultura de células VERO ou outras células sensíveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Dessa forma, segundo os resultados de sensibilidade obtidos (Figura 8), a linhagem HEK293T mostrou-se uma candidata viável para testes de determinação da potência e identidade de vacinas tetravalente da dengue.

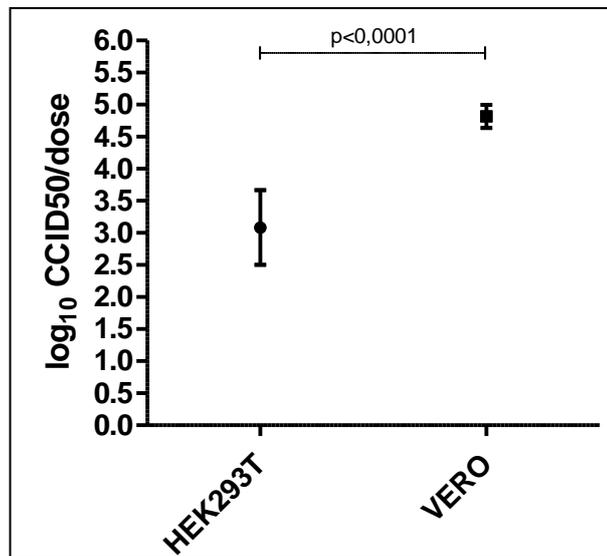
4.2 Determinação da potência e da identidade de vacina tetravalente para a dengue utilizando células HEK293T e VERO

Após determinada a susceptibilidade das células HEK293T ao vírus vacinal, deu-se sequência a determinação da potência, por CCID₅₀, e identidade da vacina utilizando a linhagem celular. Visto a menor sensibilidade apresentada pela linhagem HEK293T em comparação à linhagem VERO, as células HEK293T foram submetidas à diluições da vacina mais concentradas. Diante disso, as células HEK293T foram expostas às diluições de 10^{-1,3} até 10^{-3,4}, seguindo fator de diluição de 1:2, por três e sete dias, enquanto as células VERO foram submetidas às diluições de 10^{-2,6} até 10^{-6,8}, com fator de diluição de 1:4, pelo mesmo período de tempo (três e sete dias), para análise do título viral (potência) dos quatro sorotipos (identidade).

Após três dias de incubação, as células HEK293T demonstraram uma potência vacinal média, medida em log₁₀ CCID₅₀/dose, de 3,084± 0,58 (desvio padrão), enquanto em células VERO a potência média foi de 4,816± 0,18 (desvio padrão), conforme ilustrado na Figura 9. Ainda, quando comparadas as médias obtidas, foi vista uma diferença significativa entre os resultados das duas células (Figura 9).

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).

Figura 9 - Gráfico da potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID₅₀, determinada em células HEK293T e VERO após 3 dias de incubação com o vírus vacinal

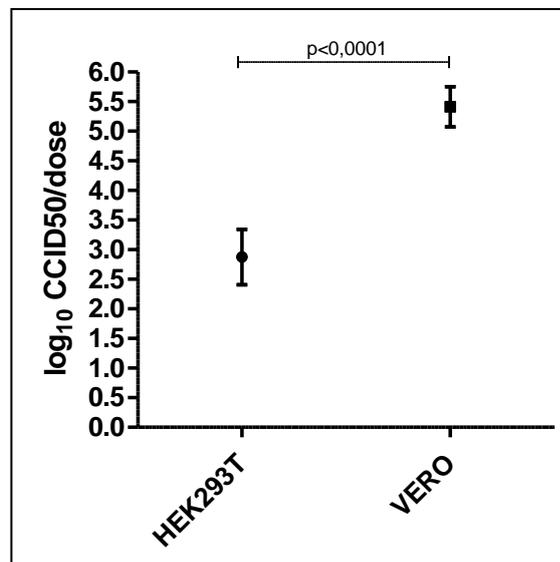


Legenda: Média das potências em células HEK293T (3,084) representada pelo círculo e a média em células VERO (4,816) pelo quadrado. As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada célula (0,58 e 0,18, para HEK293T e VERO respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de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

Fonte: O autor, 2021.

Após sete dias de incubação, a potência vacinal média obtida em células HEK293T foi de $2,876 \pm 0,46$ (desvio padrão), enquanto em células VERO a potência média foi de $5,413 \pm 0,34$ (desvio padrão), conforme ilustrado na Figura 10. Ainda, quando comparadas as médias obtidas, também foi vista uma diferença significativa entre os resultados das duas células (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico da potência vacinal média, medida em \log_{10} CCID₅₀, determinada em células HEK293T e VERO após 7 dias de incubação com o vírus vacinal

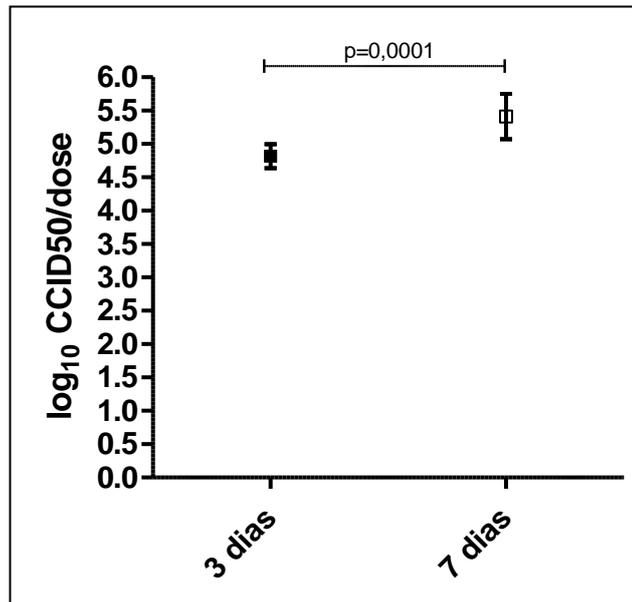


Legenda: Média das potências em células HEK293T (2,876) representada pelo círculo e a média em células VERO (5,413) pelo quadrado. As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada célula (0,46 e 0,34, para HEK293T e VERO respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de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

Fonte: O autor, 2021.

Novamente, segundo os critérios de potência do produtor, apenas as células VERO apresentaram potência vacinal média dentro do estabelecido. Contudo, é importante notar que, em comparação aos resultados de três dias, houve um aumento na potência medida em células VERO e uma diminuição na potência medida em células HEK293T. De fato, como mostra a Figura 11, o aumento da potência média, estimada após sete dias de incubação do vírus vacinal, em células VERO foi significativo. Enquanto a diferença entre as potências calculadas em células HEK293T, para três e sete dias, não apresentou significância estatística (Figura 12).

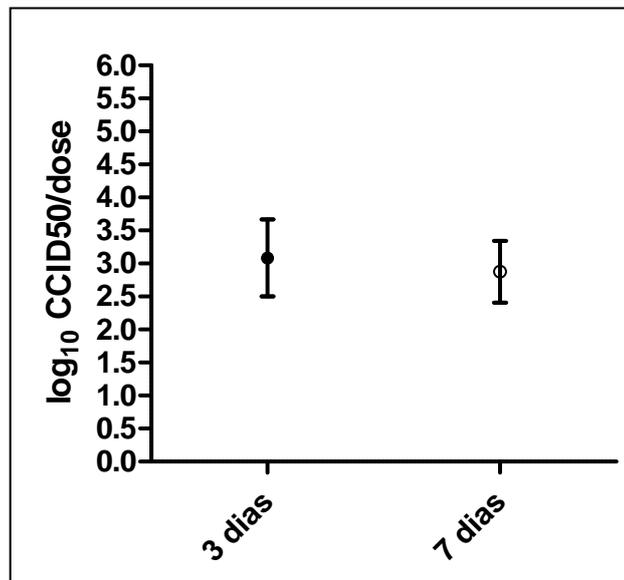
Figura 11 - Gráfico das potências médias, medida em \log_{10} CCID₅₀, estimadas em células VERO após 3 e 7 dias de incubação com o vírus vacinal



Legenda: Média das potências em células VERO após 3 dias (4,816 - quadrado preto) e 7 dias (5,413 - quadrado branco). As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada tempo (0,18 e 0,34, para 3 e 7 dias respectivamente). Resultado de p-valor obtido pelo teste T de Student. Valor de significância de $p < 0,05$.

Fonte: O autor, 2021.

Figura 12 - Gráfico das potências médias, medida em \log_{10} CCID₅₀, estimadas em células HEK293T após 3 e 7 dias de incubação com o vírus vacinal.



Legenda: Média das potências em células HEK após 3 dias (3,084 - círculo preto) e 7 dias (2,876 - círculo branco). As traves representam os valores de desvio padrão observados em cada tempo (0,58 e 0,46, para 3 e 7 dias respectivamente). Não houve diferença significativa entre as médias.

Fonte: O autor, 2021.

Esses resultados sugerem que há a presença, ou ausência, de algum mecanismo celular que proporciona um aumento, ao longo do tempo, dos títulos de infecção em células VERO, mas uma estabilidade nos títulos de infecção em células HEK293T. De fato, células VERO apresentam ausência dos mecanismos celulares que desencadeiam uma resposta antiviral por interferons do tipo 1 (DESMYTER et al., 1968), que parece estar ligada à sua alta permissibilidade às infecções virais.

Tendo em vista que é delegado ao INCQS a responsabilidade pela liberação de todos os lotes de vacinas utilizadas no país e que cada lote é submetido à uma análise dos seus padrões de qualidade, através de ensaios que determinam a eficácia (identidade, potência e estabilidade) e segurança (esterilidade, toxicidade, contaminantes, etc.) para sua liberação (BRASIL, 2008), metodologias que proporcionam celeridade ao processo, em conjunto com a confiança do método analítico, são importantes ferramentas de trabalho e pesquisa. Nesse contexto, a estabilidade nos resultados de potência, para os diferentes tempos estudados, obtida em células HEK293T configura-se como uma característica promissora no uso dessa linhagem em metodologias de análise da potência vacinal de vacinas tetravalente da dengue.

4.3 Avaliação da potência para os diferentes sorotipos do vírus vacinal de vacina tetravalente da dengue em células HEK293T

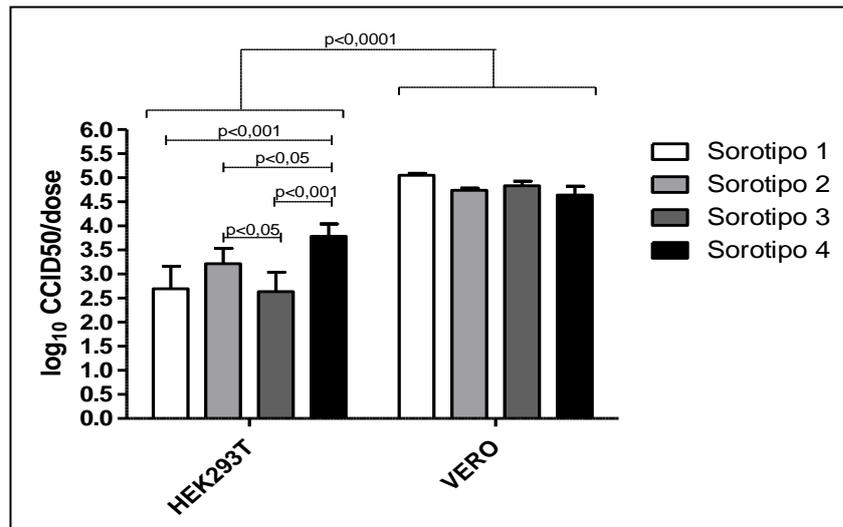
Após definidos os resultados de potência geral da vacina nas duas linhagens celulares (HEK293T e VERO), foram determinadas as potências da vacina tetravalente para cada sorotipo vacinal (identidade), tanto após três dias de incubação com o vírus vacinal, quanto após sete dias de incubação com o vírus.

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 13. Para as células VERO, as potência estimadas foram de $5,05 \pm 0,04$ (CYD-1), $4,74 \pm 0,04$ (CYD-2), $4,83 \pm 0,09$ (CYD-3) e $4,64 \pm 0,18$ (Figura 13).

Quando comparados os resultados de potência de cada grupo, a potência estimada do sorotipo 4 mostrou-se significativamente maior que as potências dos

sorotipos 1, 2 e 3 definidas em células HEK293T. Contudo, em células VERO, não houve diferença estatística entre os sorotipos.

Figura 13 - Gráfico contendo as potências médias, medida em \log_{10} CCID₅₀, de cada sorotipo do vírus vacinal para as células HEK293T e VERO após 3 dias de incubação



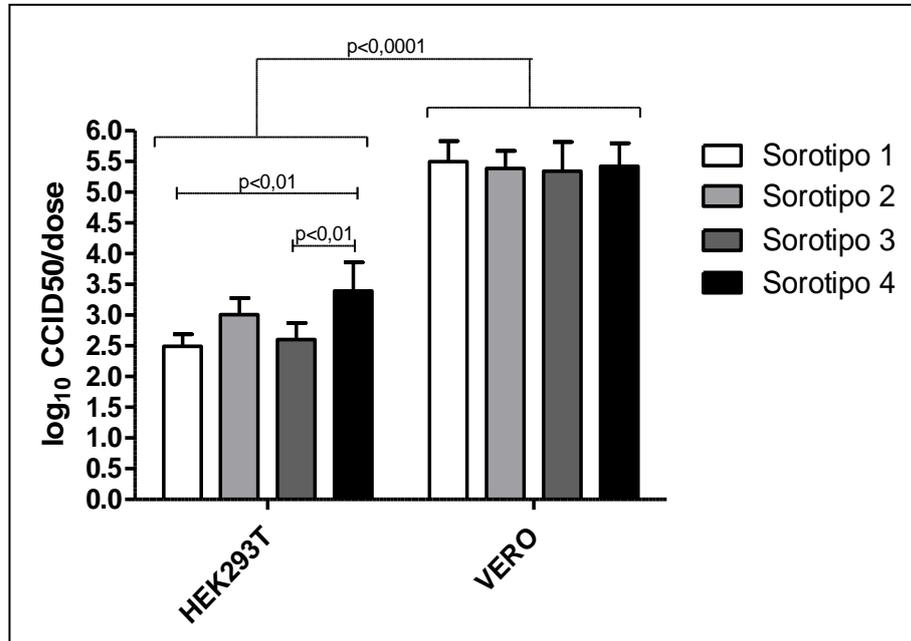
Legenda: Média das potências por sorotipo em células HEK e VERO após 3 dias. As barras representam os resultados de potência média de cada sorotipo: 1 (2,69 e 5,05 – barra branca), 2 (3,21 e 4,74 – barra cinza claro), 3 (2,63 e 4,83 – barra cinza escuro) e 4 (3,78 e 4,64 – barra preta). Resultados de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

Fonte: O autor, 2021.

Já em sete dias de infecção pelo vírus vacinal, a potência calculada, em \log_{10} CCID₅₀/dose, nas células HEK293T para cada sorotipo foi de $2,49 \pm 0,19$ (CYD-1), $3,01 \pm 0,26$ (CYD-2), $2,6 \pm 0,27$ (CYD-3) e $3,39 \pm 0,46$ (CYD-4), conforme Figura 14. Para as células VERO, as potências estimadas foram de $5,49 \pm 0,33$ (CYD-1), $5,38 \pm 0,28$ (CYD-2), $5,34 \pm 0,47$ (CYD-3) e $5,42 \pm 0,37$ (Figura 14).

Assim como para o tempo de três dias, os resultados obtidos foram comparados e a potência estimada do sorotipo 4 mostrou-se, também, significativamente maior que as potências dos sorotipos 1 e 3 definidas em células HEK293T, não apresentando diferença estatística para o sorotipo 2. Novamente, as potências estimadas de cada sorotipo em células VERO não apresentaram diferença significativa.

Figura 14 - Gráfico contendo as potências médias, medida em \log_{10} CCID₅₀, de cada sorotipo do vírus vacinal para as células HEK293T e VERO após 7 dias de incubação



Legenda: Média das potências por sorotipo em células HEK e VERO após 7 dias. 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 claro), 3 (2,60 e 5,34 – barra cinza escuro) 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. Valor de significância de $p < 0,05$.

Fonte: O autor, 2021.

O desafio ao desenvolver uma vacina segura e eficaz contra dengue é que a vacina deve gerar, simultaneamente, uma resposta imune protetora contra todos os quatro sorotipos da DENV. Uma resposta imune desbalanceada pode resultar em níveis sub-ótimos de anticorpos, podendo ocasionar o agravamento do quadro clínico de pacientes infectados pelo sorotipo não contemplado (THOMAS, 2014).

Visando garantir a manutenção correta entre os sorotipos virais e a futura resposta imunológica no indivíduo imunizado, ensaios para a avaliação da potência vacinal são executados segundo as recomendações técnicas da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Em células VERO, os ensaios com a vacina Dengvaxia® demonstraram títulos virais e de anticorpos balanceados para os quatro sorotipos virais do DENV (POO et al., 2011; MORRISON et al., 2010; CAPEDING et al., 2011; TRAN et al., 2012; LECOUTURIER et al., 2019).

Contudo, em estudos de imunogenicidade com a vacina foi observado um desbalanço nos títulos virais e de anticorpos produzidos após imunização, com uma

forte imunodominância do sorotipo 4 (DENV-4) sobre os demais sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) (HENEIN et al., 2017; GUY, 2009; VILLAR et al., 2015; CAPEDING et al., 2014).

Nesse contexto, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que ensaios de potência da vacina em células HEK293T parecem ser capazes de indicar essa dominância do sorotipo 4 sobre os demais sorotipos do vírus vacinal, enquanto em células VERO essa diferença não é detectável. Esses achados são de grande importância para o contexto das vacinas tetravalente contra a dengue e colocam as células HEK293T como uma candidata promissora para os modelos que tentam prever as respostas que serão desencadeadas nos indivíduos imunizados com esse tipo de vacina. Assim, mais estudos devem ser conduzidos a fim de melhor elucidar os mecanismos e possíveis usos da linhagem HEK293T no controle da qualidade de vacinas tetravalente contra a dengue, visto o potencial demonstrado no estudo conduzido.

5 CONCLUSÃO

A linhagem celular HEK293T mostrou-se permissiva à infecção com o vírus vacinal da Dengvaxia®. Foi possível determinar a potência e a identidade da vacina utilizando as células HEK293T. Contudo, os valores de potência estimados não se encontravam nos critérios definidos pelo produtor, de 4,5-6,0 log₁₀ CCID₅₀/dose.

Apesar disso, a linhagem celular mostrou estabilidade da infecção ao longo do tempo, com valores de potência vacinal calculada, em três e sete dias de incubação, próximos. Além disso, células HEK293T mostraram-se sensíveis às diferenças entre os sorotipos vacinais, como a imunodominância do sorotipo 4 sobre os demais, o que não foi observado nas células da linhagem celular VERO.

Dessa forma, os achados do presente estudo sugerem que a linhagem celular HEK293T é uma candidata em potencial para utilização em metodologias de definição da potência e identidade de vacinas tetravalente contra a dengue. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar completamente se essas células podem ser, de fato, uma alternativa metodológica.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Imunização. Vacina Dengue: esclarecimentos. **Nota informativa – Vacina Dengue Dengvaxia®**. 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201. Acesso em: 22 dez. 2020.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Anvisa registra primeira vacina contra dengue no Brasil**. 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_languageId=en_US. Acesso em: 22 dez. 2020.
- 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**, Baltimore, v. 73, n. 6, p.1059-62, 2005.
- BARRETT, P.N. *et al.* Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, London, v.8, n. 5, p. 607-618, 2009.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, p. 504–7, 2013.
- BRADY, O.J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 38**, Brasília, v. 51, n. 38, 2020. Disponível em <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/24/Boletim-epidemiologico-SVS-38.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2020.
- BRASIL. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução DC/ANVISA n. 73 de 21 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 out. 2008.
- 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.
- CAPEDING, R.Z. *et al.* Live-attenuated, tetravalent dengue vaccine in children, adolescents and adults in a dengue endemic country: randomized controlled phase I trial in the Philippines. **Vaccine**, Amsterdam, v.29, p.3863-3872, 2011.

CAPEDING, M.R. *et al.* Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, London, v.384, p.1358-1365, 2014.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. Principles of vaccination. **Immunology of vaccine-preventable diseases**. 2015. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/prinvac.html>. Acesso em: 22 dez. 2020.

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

DAYAN, G.H. *et al.* Assessment of bivalent and tetravalent dengue vaccine formulations in flavivirus-naive adults in Mexico. **Hum. Vaccin. Immunother.**, Texas, v.10, n. 10, p.2853-2863, 2014.

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). **J. Virol.**, Washington, v. 2, n. 10, p. 955–961, 1968.

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

DVI – Dengue Vaccine Initiative. **Vaccine Development**. [S. I.], 2016. Disponível em <http://www.denguevaccines.org/vaccine-development>. Acesso em: 23 dez. 2020.

DVI – Dengue Vaccine Initiative. Development of Dengue Vaccine. A review of the status and future considerations. **Report of the Americas Dengue Prevention Board Meeting**. Bogotá, 2015. Disponível em: <http://www.denguevaccines.org/sites/default/files/Americas%20Dengue%20Prevention%20Board%20-%20Bogota%202015.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2020.

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**, Washington, v.7, n. 1, e. 1956-15, 2016.

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

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**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. e0004821, 2016.

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

GUY, B. *et al.* Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, n. 2, p. 51-64, 2011.

GUY, B. Immunogenicity of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. **Journal of Clinical Virology**, Holanda, v.46, n. 2, p.S16-S19, 2009.

GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, London, v.385, n. 9966, p. 453-465, 2015.

HADINEGORO SRS. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatrics and International Child Health**, London, v.32, suppl 1, p.33-8, 2012.

HADINEGORO, S.R.S. *et al.* Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 13, p. 1195-1206, 2015.

HALSTED, S.B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, New York, v.239, n. 4839, p. 476-81, 1988.

HAN S. Clinical vaccine development. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, Seoul, v. 4, n. 1, p. 46-53, 2015.

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**, Oxford, v. 215, n. 3, p.351-358, 2017.

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

KASVI. **A importância da qualidade para o cultivo celular**. 2017. Disponível em: <http://www.kasvi.com.br/qualidade-cultivo-celular/>. Acesso em: 22 dez. 2020.

KUMAR, S. *et al.* Quality control of vaccines – A journey from classical approach to 3Rs. **Microbiol. Curr. Res.**, Singapura, v. 2, n. 3, p. 45-61, 2018.

LAM SK. Challenges in reducing dengue burden; diagnostics, control measures and vaccines. **Expert Review of Vaccines**, London, 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**, Washington, 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**, Chicago, v. 195, n. 8, p. 1108 -16, 2007.

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

- LIEBHABER, H.; RIORDAN, J.T.; HORSTMANN, D.M. Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.125, p.636-643, 1967.
- 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**, New York, v.233, p.423-429, 1997.
- MALM, M. *et al.* Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. **Scientific Reports**, Reino Unido, v.10:18996, 2020.
- 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**, Oxford, v.216, n. 9, p.1164-1175, 2017.
- METZ, B. *et al.* Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, p. 2411–2430, 2002.
- 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.
- 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.
- 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. J. Infect. Dis.**, Hamilton, 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 Rev. Vaccines**, London, v.11, p.587–594, 2012.
- MORRISON, D. *et al.* A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naive adults. **J Infect Dis**, Chicago, v. 201, p.370-377, 2010.
- MURPHY, B.R.; WHITEHEAD, S.S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 29, p. 587 – 619, 2011.
- O'RYAN, M. Rotarix (RIX4414): an oral human rotavirus vaccine. **Expert Rev. Vaccines**, London, v.6, p. 11-19, 2007.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Media Centre. Fact sheets. **Dengue and Severe dengue**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 20 dez. 2020.

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_recommendations_dengue_vaccines_apr2018/en/. Acesso em: 20 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue explorer**. 2017a. Disponível em: <https://ntdhq.shinyapps.io/dengue5/> Acesso em: 20 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines. Biologicals. Clinical evaluation of vaccines. **Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations**. 2017b. (WHO technical report series nº 1004, annex 9). Disponível em https://www.who.int/biologicals/expert_committee/WHO_TRS_1004_web_Annex_9.pdf?ua=1. Acesso em: 20 dez. 2020.

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

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: 21 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Immunization, Vaccines and Biologicals. **Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas**. 2008. (WHO/IVB/08.12). Disponível em https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69850/WHO_IVB_08.12_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 21 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. **Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses**. Geneva, 2007. (WHO/IVB/07.07). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69687/who_ivb_07.07_eng.pdf;jsessionid=884ACFEF80DC315731AF90F851D42626?sequence=1 Acesso em: 22 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vaccines. Biologicals. Nonclinical evaluation of vaccines. **Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines**. 2005. (WHO technical report series nº 927, annex 1). Disponível em: https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%20Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1. Acesso em: 22 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997. Disponível em:

<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>. Acesso em: 20 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Epidemiological Updates: **Dengue in the context of COVID-19**. Washington, D.C. PAHO/ WHO, 3 dez. 2020a. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-dengue-context-covid-19-3-december-2020>. Acesso em: 23 dez. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Epidemiological Updates: **Arbovirus**. Washington: PAHO/ WHO, 10 jun. 2020b. Disponível em <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-dengue-and-other-arboviruses-10-june-2020>. Acesso em: 23 dez. 2020.

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

POO, J. *et al.* Live-attenuated Tetravalent Dengue Vaccine in Dengue-naive Children, Adolescents, and Adults in Mexico City: Randomized Controlled Phase 1 Trial of Safety and Immunogenicity. **Pediatr Infect Dis J.**, Baltimore, v.30, p.9-17, 2011.

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

RATTANACHUEN, W. *et al.* The contribution of host cells to dengue virus infectivity. **Afr J Microbiol Res.**, Lagos, v.5, p.117-122, 2011.

REITER, P. Yellow fever and dengue: a threat to europe? **Euro Surveill**, Stockholm, 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). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, 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). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.132, p.670–678, 1969.

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

RUNGRUENGPHOL, C. *et al.* Evidence of plasticity in the dengue virus: Host cell interaction. **Microb Pathog.**, London, v.86, p.18-25, 2015.

SAN MARTIN, J. L. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, 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**, São Paulo, 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 Arch. Exp. Med.**, Tokyo, v.37, p.27-42, 1964.

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

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), **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v. 125, p.119-123, 1967.

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

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

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

TRAN, N.H. *et al.* Safety and Immunogenicity of Recombinant, Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine (CYD- TDV) in Healthy Vietnamese Adults and Children. **J Vaccines Vaccin**, Los Angeles, v.3, n.7, 2012.

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**, Taipei, v.46, n. 4, p.271-281, 2013.

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

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

WHITE, L.J. *et al.* Defining levels of dengue virus serotype-specific neutralizing antibodies induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TAK-003). **bioRxiv**, 2020. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.23.308817v1.full>. Acesso em: 6 jan. 2021.

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**, Basel, v.12, n. 8, p. 802, 2020.

YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro. **Nihon Rinsho**, Japão, v.21, p.1201-15, 1963.

ZELLWEGER, R.M. *et al.* Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 10, 2013.