

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

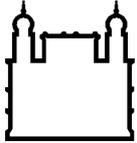
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*Mapeamento da resposta imune protetora
induzida por uma vacina de DNA contendo o
gene NS1 de dengue 2*

Antonio José da Silva Gonçalves

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*Mapeamento da resposta imune protetora
induzida por uma vacina de DNA contendo o
gene NS1 de dengue 2*

Antonio José da Silva Gonçalves

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

Orientadora: Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

RIO DE JANEIRO

2013

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mapeamento da resposta imune protetora induzida por uma vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2

Antonio José da Silva Gonçalves

Aprovada em: 15 de agosto de 2013

Banca examinadora:

Dra. Vivian Rumjanek (Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ/RJ)

Dra. Cecília Gonçalves de Almeida (FIOCRUZ/RJ)

Dr. Marcelo Torres Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ/RJ)

Suplentes:

Dra. Juliana de Meis (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ) (**Revisora**)

Dra. Luzia Maria Oliveira Pinto (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

RIO DE JANEIRO

2013

Dedico este trabalho a minha mãe Eneri, que sempre foi fundamental nas minhas escolhas e decisões e sempre me apoiou em tudo na vida.

Ao meu amor Gabriela, uma menina maravilhosa, enviada por DEUS.

Às minhas amigas Rosane Temporal, Simone Costa e Renata Maia por toda dedicação, paciência, companheirismo e confiança. Grandes incentivadoras que, por vezes, acreditaram mais em mim do que eu mesmo.

*“Escolha um trabalho de que gostes, e não terás que
trabalhar um único dia na tua vida.”
Confúcio*

*“Não há fatos eternos, como não há verdades
absolutas.”
Friedrich Nietzsche*

Agradecimento

O que são estas palavras diante do sentimento profundo que tenho por cada um de vocês, porém, como sentimento não pode de ser expresso em palavras, usarei estas para lembrá-los do quanto são importantes.

Agradeço a Deus, a São Francisco de Assis e a Santo Antonio, por estar sempre ao meu lado e por ter colocado pessoas na minha vida que permitiram que eu pudesse estar onde estou hoje.

À minha mãe Eneri, além de amiga, você é a pessoa cativante, uma guerreira, com o seu jeito cativante, arrebatador e divertido de encarar a vida. E como diz a letra daquela canção, você é pra mim é a “minha musa inspiradora, minha fé, minha paixão. Alegria duradoura, dentro do meu coração.” Muito obrigado por ser seu filho!!!

Ao meu pai Antonio Gonçalves (*in memoriam*), alicerce da minha vida, exemplo de ser humano e caráter. Meu agradecimento eterno pelos seus ensinamentos. Quanta falta você me faz pai!

Aos meus irmãos Luiz e Andréia, a Sandra e a minha avó Irene e a minha sobrinha Gabi pelo apoio, carinho, respeito e amor.

À minha orientadora Dra. Ada Alves, sou-lhe grato pela oportunidade oferecida de compor a sua equipe, pela base científica, por me dar a mão e me mostrar o melhor caminho a ser percorrido, por ser tão presente, pela competência, pelo convívio, pelo carinho e pelos “puxões de orelha” e principalmente pela amizade! É difícil descrever em palavras o quanto você é especial! Meu muito obrigado.

Aos meus amigos do LABIFIV: Simone (meu anjo), Adriana, Kíssila (minha sobrinha emprestada) Paolla Beatriz e Juliana, Edson, Márcio, Tiago e Marciano por terem me auxiliado diretamente, tendo papel muito importante para a realização neste trabalho, sem vocês esse trabalho não seria possível e por serem pessoas incríveis. Adoro vocês!!!

Às amigas e ex-integrantes do LABIFIV: Manu, Anna, Mariana, Aline e Tamires. Saudades.

Aos colegas do LABIFIV que fizeram cada dia de trabalho mais especial: Dra. Ana Cristina, Guilherme. Domingos, Eduardo, Rafael, e Natálias (sim são duas).

Ao meu amigo Rogério dos Santos o Kappa, obrigado pelas conversas, por sua amizade, por me fazer feliz, mesmo quando pensei que tal sentimento não existia...

Aos meus amigos Ricardo de Lorenzi e Tiago Rangel, pessoas incríveis que entraram na vida por acaso; mas não é por acaso que elas permanecem !

A minha amiga Rosane, amiga de uma vida, meu muito obrigado!!! Quero muito te agradecer, por sua atenção, incentivo, carinho, amizade, resumindo por cuidar tão bem de mim.

A Renata Maia e Grazi minhas amiguinhas do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, que me ajudaram tanto. Amo vocês !

À Dra. Cecília Jacques Gonçalves, pela ajuda nos experimentos de transferência de células.

Agradeço as secretárias Aline e Fernanda do Pavilhão Leônidas Deane pela assistência de sempre!

Agradeço os secretários do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Daniela e Vinícios, pela assistência durante o doutorado.

A equipe do Centro de Experimentação Animal, no biotério do Pavilhão Leônidas Deane do Instituto Oswaldo Cruz.

Aos meus amigos do LIPMED: Rosimar Baptista (Rosi) Glória Este, Alcina Nicol, Alda Cruz, Márcia Oliveira, e Luiza Pereira.

À Dra. Claude Pirmez, pela sua amizade e por me ensinar a gostar de fazer ciência. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos de longa data da FIOCRUZ: Glória Este, Valéria Trajano, Thereza Benévolo, Rosa Pinho, Ricardo Montarroyo, Délcio, Léa Cysne Mauro Muniz e Cláudia Pizzine. Vocês contribuíram de forma vital para que eu chegasse a esse momento.

Agradeço o Dra. Myrna por abrir as portas de seu laboratório para fazermos os experimentos.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

Agradeço o Dra. Juliana de Meis pela sua colaboração, e revisão desta Tese. As suas sugestões contribuíram para enriquecer ainda mais este trabalho.

Ao anterior Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Dr. Alexandre Peixoto (*in memoriam*) e os atuais Coordenadores Dr. Milton Ozório Moraes e Dr^a. Leila Mendonça Lima, pela compreensão, apoio e estímulo.

Ao CNPQ, PDTIS, FAPERJ, INCTV e PRONEX pelo apoio financeiro.

Apesar de ter citado nomes de pessoas ligadas a esse trabalho, agradeço a todos que passaram pela minha vida e que, deixando alegrias ou mágoas, boas ou más recordações, ajudaram a formar a pessoa que sou hoje... Sem todas essas experiências que passei, talvez não tivesse sido guiado até aqui!

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês, <i>antibody dependent enhancement</i>)
ALT	Alanina amino transferase
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato amino transferase
BGH	Hormônio de crescimento bovino (do inglês <i>bovine growth hormone</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CBA	Análise citométrica por microesferas e fluoróforos (do inglês <i>cytometric bead array</i>)
CD	Marcador de membrana (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
ColE1	Origem de replicação de <i>Escherichia coli</i>
CPE	Efeito citopático
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CSFE	Diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster (do inglês <i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>)
D.O.	Densidade ótica
DC-SIGN	Molécula intracelular 3 de adesão específica de células dendríticas (do inglês: <i>(dendritic cell)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbin nonintegrin</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	Antígeno solúvel de fixação de complemento
FD	Febre do dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HLA	Antígenos leucocitários humanos (do inglês <i>human leukocyte antigen</i>)
HSP70	Proteínas de choque térmico 70 (do inglês <i>heat shock protein 70</i>)
HSP90	Proteínas de choque térmico 90 (do inglês <i>heat shock protein 90</i>)
i.c	Intracerebral
i.d.	Intradérmica
i.m	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
LAMP	Proteína lisossomal associada à membrana (do inglês <i>lysosomal-associated membrane protein</i>)
LAV	vacina de vírus vivo atenuado (LAV, do inglês: <i>live attenuated virus vaccine</i>)
LB	meio <i>Luria Broth</i>
LD ₅₀	Dose letal para 50 % da população em teste (do inglês: <i>lethal doses 50 %</i>)
L-SIGN	Molécula de adesão 3 intracelular específica de linfonodos/fígado (do

	inglês Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin)
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (do inglês <i>major histocompatibility complex</i>)
mNS1	Proteína não estrutural 1 associada à membrana
MoAb	Anticorpos monoclonais (do inglês monoclonal antibody)
MVA	Vírus Vaccinia Ankara Modificado (do inglês: <i>modified vaccinia Ankara</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>)
NK	Célula assassina natural (do inglês <i>natural killer cell</i>)
NS	Não estrutural
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	O-fenilendiamina dihidrocloro
ORF	Padrão de resposta aberta
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
pCMV	Promotor do Citomegalovírus
pcTPA	Vetor construído a partir do plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen) que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante do sítio de clonagem
pcTPANS1	Vetor construído a partir do plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen), contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante ao sítio de clonagem fusionado ao gene <i>ns1</i> de DENV2, cepa Nova Guiné
PDK	Células de rim de cachorro (do inglês <i>dog kidney cells</i>)
prM	Precursor da proteína de membrana
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína de membrana
pRSV	Promotor Rous vírus
pSV40	Promotor Símio-vírus 40
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do inglês: <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RTG	Rede trans-Golgi
SCD	Síndrome do choque da dengue
sNS1	Proteína não estrutural 1 secretada
SPF	Livre de patógenos (do inglês <i>specific pathogen free</i>)
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TCR	receptores de células T
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta (do inglês: <i>Transforming growth factor beta</i>)
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>)
t-PA	ativador de plasminogênio de tecido humano
VEE	Vírus encefalomielite equina venezuelana (do inglês: <i>venezuelan equine encephalitis virus</i>)
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
YF17D-D2	Vírus quimérico febre amarela-dengue sorotipo 2

RESUMO

O vírus da dengue compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV1-4) e até o momento não existe nenhuma vacina disponível comercialmente contra este patógeno. Alguns autores apontam a proteína NS1 de DENV como um antígeno protetor. Entretanto, ainda não se sabe ao certo o seu papel na replicação viral, bem como na indução de proteção ou patogênese. Nosso grupo vem trabalhando com as vacinas de DNA contra a dengue, testando-os em modelos murinos. Camundongos imunizados com uma vacina de DNA (pcTPANS1), que contém o gene NS1 de dengue 2 (DENV2), mostraram altos níveis de anticorpos anti-NS1 e quase 100 % de proteção quando desafiados com DENV2 (4 LD₅₀). Este projeto tem por objetivo o mapeamento da resposta imune protetora gerada pela vacina pcTPANS1. Os resultados revelaram que 50 % dos animais que receberam o soro de outros camundongos, previamente imunizados com o plasmídeo pcTPANS1, sobreviveram à infecção após o desafio com DENV2 (4 LD₅₀). Entretanto quando utilizamos um segundo estoque viral com 40 LD₅₀, todos os animais apresentaram altas taxas de mortalidade e fortes sinais clínicos da infecção, com exceção do grupo de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1. Posteriormente analisamos o papel da resposta imune celular na proteção. O ensaio de depleção *in vivo* mostrou que todos os animais vacinados e depletados de células CD4⁺ morreram após o desafio com DENV2, enquanto que 60 % dos animais depletados de CD8⁺ sobreviveram à infecção. Os ensaios de transferência adotiva de células T mostraram proteção somente no grupo de camundongos que receberam concomitantemente soro e linfócitos TCD4⁺ provenientes de animais imunizados com a vacina pcTPANS1. As células obtidas do baço de animais vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 foram capazes de secretar IFN- γ após estímulo com o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, contido na proteína NS1 de DENV2 e descrito na literatura como específico para células TCD8⁺. Também avaliamos *in vivo* uma possível atividade citotóxica específica para este peptídeo. Nossos resultados mostraram que os camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 promoveram a lise das células alvo pulsadas anteriormente com o peptídeo. Além disso, quando células alvos foram administradas 72 horas após o desafio com DENV2, houve um aumento significativo do percentual de lise. Em outro ensaio para avaliação de citotoxicidade *in vivo*, os animais foram imunizados com pcTPANS1 e submetidos ao tratamento para depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺. Nossos resultados demonstraram que a atividade citotóxica específica para o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ é atribuída principalmente à população de células TCD8⁺, pois quando analisamos os resultados obtidos com animais imunizados e depletados de células TCD8⁻ o percentual de lise foi reduzido para 37,9 %, corroborando os dados da literatura que descreve este peptídeo como específico para células TCD8⁺. Além disso, avaliamos a indução de possíveis danos gerados com a vacina pcTPANS1, tanto por análises histopatológicas do fígado quanto por dosagens dos níveis séricos de enzimas hepáticas, sem a detecção de qualquer alteração nos animais imunizados. De um modo geral, o conjunto de resultados obtidos nesse trabalho sugere que a proteção mediada pela vacina pcTPANS1 no nosso modelo experimental está relacionada principalmente com a resposta de células TCD4⁺ em associação com anticorpos anti-NS1, embora a vacina ative também uma resposta de células TCD8⁺ citotóxica.

ABSTRAT

Dengue virus comprises four antigenically distinct serotypes (DENV1-4). Nowadays, there is no commercially available vaccine against this pathogen. Some authors point out the NS1 protein from DENV as a protective antigen, however, its role in viral replication, as well as in the induction of protection or pathogenesis, remains still unclear. Our group has been working with DNA vaccines against dengue testing them in murine models. Mice immunized with one DNA vaccine (pcTPANS1), which contains the NS1 gene from dengue 2 (DENV2), showed high levels of anti-NS1 antibodies and almost 100 % protection when challenged with DENV2 (4 LD₅₀). This project aims to map the protective immune response generated by the pcTPANS1. Results showed that 50 % of animals that received serum from other mice, previously immunized with the pcTPANS1, survived infection after challenge with DENV2 (4 LD₅₀). However when we used a second viral stock with 40 LD₅₀, all animals showed high mortality rates and strong clinical signs of infection, except the mouse group immunized with the pcTPANS1 vaccine. Subsequently, we analyzed the role of the cellular immune response in protection. The *in vivo* depletion assay showed that all vaccinated and depleted from CD4⁺ cells died after challenge with DENV2, whereas 60 % of CD8⁺ depleted animals survived infection. The assays of T cell adoptive transfer showed protection only in the mouse group receiving concomitantly serum and CD4⁺ T lymphocytes recovered from animals immunized with the pcTPANS1 vaccine. Splenocytes obtained from pcTPANS1 vaccinated animals were able to secrete IFN- γ after stimulation with the peptide ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, present in NS1 protein from DENV2 and described as specific for CD8 + T cells. We also analyzed *in vivo* a possible cytotoxic activity specific for this peptide. Our results showed that mice immunized with the pcTPANS1 vaccine promoted the lysis of target cells previously pulsed with the peptide. Besides, when target cells were given 72 hours after challenge with DENV2, there was a significant increase in the lysis percentage. In another assay for the assessment of *in vivo* cytotoxicity, animals were immunized with pcTPANS1 and subjected to treatment for depletion of CD4⁺ or CD8⁺ cells. Our results showed that the cytotoxic activity specific for the peptide ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ is attributed mainly to the population of CD8⁺ T cells, because when we analyzed results obtained from animals immunized and depleted of CD8 T cells, the lysis percentage was reduced to 37.9 %, corroborating data from literature which describes this peptide as specific for CD8⁺ T cells. Moreover, we evaluated the induction of possible damages generated by the pcTPANS1 vaccine, either by histopathological analysis in the liver or by quantification of serum levels of hepatic enzymes, without detection of any alteration in immunized animals. In general, results obtained in this work suggest that protection mediated by the pcTPANS1 vaccine in our experimental model is related mainly to the CD4⁺ T cells response in association with anti-NS1 antibodies, although the vaccine also activates a CD8⁺ T cells cytotoxic response.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Mapa de risco da dengue no mundo	02
Figura 1.2	Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue	05
Figura 1.3	Sorotipos de Dengue isolados no Brasil por estado, janeiro-agosto 2011	07
Figura 1.4	Representação esquemática da inoculação do DENV pelo mosquito vetor na pele do hospedeiro	09
Figura 1.5	Ciclo de replicação do DENV	11
Figura 1.6	Estrutura e genômica do DENV	12
Figura 1.7	Representação esquemática da tradução e processamento da poliproteína viral	14
Figura 1.8	Representação esquemática do mecanismo de ADE	22
Figura 1.9	Representação esquemática do mecanismo proposto de reatividade cruzada em linfócitos T de memória	24
Figura 1.10	Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA	38
Figura 3.1	Representação esquemática dos plasmídeos	50
Figura 3.2	Esquema da imunização passiva seguido de desafio com DENV2	56
Figura 3.3	Representação esquemática do protocolo de padronização do ensaio de depleção	58
Figura 3.4	Representação esquemática do ensaio de imunização dos animais com a vacina pcTPANS1, seguida de depleção in vivo das células CD4+ e CD8+ e desafio com uma dose letal de DENV2	59
Figura 3.5	Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade in vivo	66
Figura 3.6	Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade in vivo com depleção de células CD4+ e CD8+	67
Figura 4.1	Eletroforese em gel de agarose 1% com os plasmídeos recombinantes	71
Figura 4.2	Sobrevivência e grau de morbidade nos camundongos inoculados com DENV2.	73
Figura 4.3	Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 no pool de soros de camundongos imunizados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA	74

Figura 4.4	Representação esquemática do ensaio de imunização passiva com soros de animais previamente imunizados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados com DENV2	75
Figura 4.5	Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c inoculados com o <i>pool</i> de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2	76
Figura 4.6	Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c imunizados com a vacina pcTPANS1 ou inoculados com o <i>pool</i> de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 e desafiados ou não com DENV2	77
Figura 4.7	Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c inoculados com o <i>pool</i> de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2	79
Figura 4.8	Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c inoculados com o <i>pool</i> de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2	80
Figura 4.9	Padronização dos ensaios de depleção <i>in vivo</i> de células CD4+ e CD8+	81
Figura 4.10	Dot plot representando a porcentagem de células TCD4+ ou TCD8+ observadas no sangue de um animal controle ou camundongos tratados com 25 µl do fluido ascítico com anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8	81
Figura 4.11	Representação esquemática do protocolo de imunização dos animais e depleção das células T CD4+ e T CD8+, seguido do desafio com uma dose letal de DENV2 (4,0 LD50)	83
Figura 4.12	Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c (n=10) imunizados com a vacina pcTPANS1, depletados de células CD4+ ou CD8+ e desafiados com uma dose letal de DENV2 (4,0 LD50)	84
Figura 4.13	Título de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c que sobreviveram ao desafio após as depleções	85
Figura 4.14	Transferência adotiva de células TCD4+ e TCD8+:	

	percentual de sobrevivência e grau de morbidade	89
Figura 4.15	Níveis séricos de citocinas dos animais vacinados ou não com pcTPANS1	91
Figura 4.16	Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos que sobreviveram ao desafio com DENV2	92
Figura 4.17	Produção de IFN- γ induzida pela vacina pcTPANS1 determinada por ensaio de ELISPOT	93
Figura 4.18	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vivo</i>	95
Figura 4.19	Ensaio de Citotoxicidade <i>in vivo</i> com depleção de células CD4+ e CD8+	96
Figura 4.20	Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 no pool de soros (n=5) de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1	97
Figura 4.21	Níveis séricos de ALT e AST em animais <i>naives</i> inoculados com soro de camundongos previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou com a vacina pcTPANS1	98
Figura 4.22	Fotomicrografias de cortes de parafina do fígado de um camundongo naive, incubado com o soro de animais imunizados com: a vacina pcTPANS1; o plasmídeo controle pcTPA; ou o soro de pré-imune	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	A classificação tradicional e a revisada da gravidade da dengue segundo a OMS	20
Tabela 1.2	Vacinas contra dengue em ensaios clínicos	32
Tabela 1.3	Vantagens na utilização das vacinas de DNA	44
Tabela 3.1	Distribuição dos grupos experimentais para a realização do ensaio de transferência adotiva de célula TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ e posterior desafio com DENV2	61
Tabela 3.2	Painel de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica de células provenientes de baço ou sangue dos animais	63
Tabela 4.1	Percentual de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ nos camundongos (n=3) após as inoculações com os fluidos ascíticos, quantificado por citometria de fluxo.	82
Tabela 4.2	Percentual de células TCD4 ⁺ , TCD8 ⁺ e B nas diferentes subpopulações após os ensaios para enriquecimento de linfócitos T e quantificação por citometria de fluxo	86
Tabela 4.3	Distribuição dos grupos experimentais para a realização do ensaio de transferência adotiva de célula TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ e posterior desafio com DENV2	87

ÍNDICE

1 Introdução	01
1.1 A dengue	02
1.2 Histórico da dengue e Epidemiologia	03
1.2.1 No mundo	03
1.2.2 No Brasil	05
1.3 Ciclo de vida do vírus e transmissão	07
1.4 Vírus da dengue	11
1.5 Proteínas do vírus da dengue	14
1.5.1 A proteína NS1	17
1.6 A doença	19
1.6.1 Patogênese da dengue	21
1.7 Modelos experimentais	27
1.8 Resposta imune protetora	29
1.9 Vacinas contra a dengue	31
1.9.1 Vacinas vivas atenuadas contra a dengue	32
1.9.2 Vacinas quiméricas vivas atenuadas	33
1.9.3 Vírus inativados e purificados	36
1.9.4 Vacinas de subunidade	36
1.9.5 Outras vacinas	37
1.10 Vacinas de DNA	37
1.10.1 Os plasmídeos	38
1.10.2 Adjuvantes e resposta imune induzida com as vacinas DNA.	40
1.10.3 Vias de administração	41
1.10.4 Vacinas de DNA licenciadas e ensaios clínicos	42
1.10.5 Vantagens das vacinas de DNA	43
1.10.6 Vacina de DNA para dengue.	44

2 Objetivos	47
2.1 Objetivo Geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 Materiais e Métodos	49
3.1 Plasmídeo vacinal	50
3.2 Purificação dos DNAs plasmidiais	51
3.3 Vírus	52
3.4 Estoque viral	52
3.5 Animais	53
3.6 Cálculo da LD ₅₀ de DENV neuroadaptado	53
3.7 Imunização de camundongos BALB/c	54
3.8 Desafios com DENV2	54
3.9 ELISA	55
3.10 Imunização passiva de anticorpos	55
3.11 Produção de anticorpos monoclonais anti-CD4 ⁺ e anti-CD8 ⁺ ..	56
3.11.1 <i>Hibridomas</i>	56
3.11.2 <i>Produção de ascite em camundongos</i>	57
3.12 Ensaio de depleção in vivo de subpopulações de células T ...	57
3.12.1 <i>Padronização do ensaio de depleção in vivo</i>	57
3.12.2 <i>Depleção de células T</i>	58
3.13 Ensaio de transferência adotiva de subpopulações de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	59
3.13.1 <i>Isolamento de subpopulações enriquecidas de células TCD4⁺ ou TCD8⁺</i>	59
3.13.2 <i>Transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais vacinados para animais não imunizados e desafiados com uma dose letal de DENV2</i>	60
3.14 Análise fenotípica das populações celulares por citometria de	

fluxo	62
3.15 Detecção de células produtoras de INF- γ por ELISPOT	63
3.16 Análise quantitativa de citocinas séricas	64
3.17 Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	67
3.18 Imunohistoquímica	69
3.19 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas no soro de animais	69
3.20 Análise Estatística	69
4 Resultados	70
4.1 Vacinas de DNA	71
4.2 LD ₅₀ de DENV neuroadaptado	72
4.3 Ensaio de imunização passiva de anticorpos	73
4.4 Ensaio de depleção <i>in vivo</i> de sub-populações de células T ...	80
4.4.1 <i>Padronização do ensaio de depleção in vivo:</i>	80
4.4.2 <i>Efeito da depleção de células CD4⁺ e CD8⁺ nos animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com uma dose letal de DENV2.</i>	82
4.5 Ensaio de transferência adotiva de subpopulações de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	85
4.5.1 <i>Padronização do protocolo para a obtenção de subpopulações enriquecidas de células TCD4⁺ ou TCD8⁺</i>	86
4.5.2 <i>Efeito da transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais vacinados para animais não imunizados e desafiados com uma dose letal de DENV2</i>	86
4.6 Produção de INF- γ nos animais imunizados com a vacina pcTPANS1	92
4.7 Ensaio de Citotoxicidade <i>in vivo</i>	93
4.8 Avaliações do papel de anticorpos anti-NS1 na patogênese da dengue	97

5 Discussão	100
6 Conclusões	109
7 Perspectivas	111
8 Referências Bibliográficas	113

1 Introdução

1.1 A dengue

A dengue é a mais importante arbovirose tropical transmitida aos humanos e provavelmente mais importante do que a malária, em termos de morbidade e impacto econômico. Esta doença, endêmica na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, é transmitida aos seres humanos pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* e tem como principal vetor o *Aedes aegypti* (Laughlin *et al.*, 2012; Were, 2012). Os estudos mais recentes estimam que 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, com cerca de 230 milhões de infecções anuais e mais de dois milhões de casos que evoluem para as formas mais graves da doença, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque (SCD) (Bhatt *et al.* 2013). Anualmente, cerca de 21.000 mortes são atribuídas a esta infecção (fig.1.1).

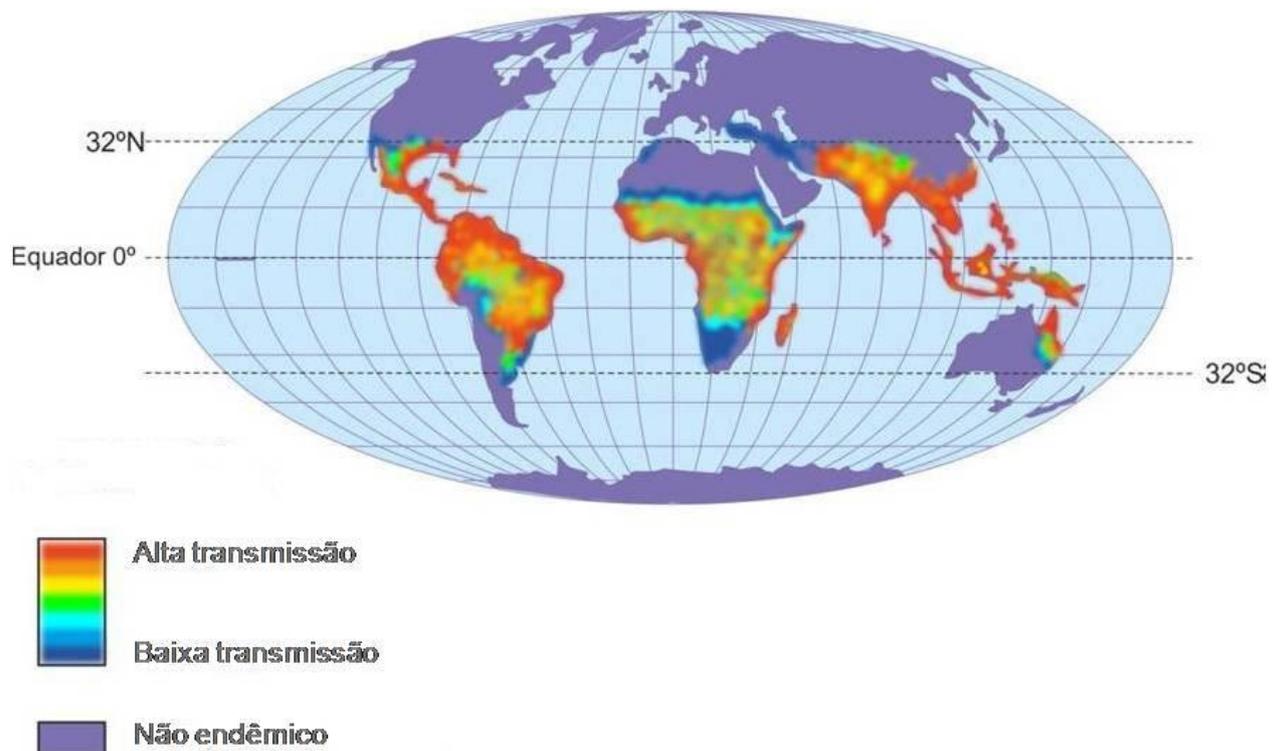


Figura 1.1 - Mapa de risco da dengue no mundo. O mapa indica as áreas de maior e menor risco de dengue e áreas não endêmicas. A transmissão é documentada nas áreas tropicais e subtropicais do globo, incluindo países nas Américas, África e Ásia. (modificado de Simmons *et al.*, 2012). N=norte; S=sul

O agente etiológico dessa infecção é o vírus da dengue (DENV), membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*. Este gênero, que inclui um grande número de agentes causadores de doenças humanas, como febres,

encefalites e febres hemorrágicas, compreende aproximadamente 80 membros, cuja maioria é transmitida por artrópodos (Chambers *et al*, 1990). Existem quatro sorotipos de DENV antigenicamente distintos (DENV1-4), que exibem aproximadamente 65 % de homologia entre si (Henchal & Putank, 1990; Lindebach & Rice, 2007). Deste modo, a patogenia da dengue continua sendo um grande desafio, principalmente devido à interposição de fatores virais e do hospedeiro, dificultando o desenvolvimento de vacinas para esse vírus. Além disso, apesar da infecção com um determinado sorotipo viral induzir uma imunidade a este sorotipo, não existe uma proteção cruzada de longa duração contra a infecção com os outros sorotipos. Ao contrário, em regiões onde circulam vários sorotipos de DENV, como no Brasil, ocorrem freqüentemente infecções sequenciais, o que leva a um agravamento dos quadros clínicos da doença (Kurane, 2007). Devido à grande importância desta doença para a saúde pública, a Organização Mundial de Saúde elegeu o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue como uma de suas prioridades (WHO, 2009).

1.2 Histórico da dengue e Epidemiologia

1.2.1 No mundo

O vírus da dengue provavelmente se originou de vírus que circulavam em primatas na proximidade da península da Malásia e foram transmitidos ao homem (Wang *et al*, 2000; Forattini, 2002, Forattini & Brito, 2003). A ocorrência da dengue tornou-se amplamente distribuída nos trópicos entre os séculos XVIII e XIX com a expansão do comércio e via de transportes marítimos (Gubler, 1997).

Contudo as primeiras descrições de epidemias atribuídas à dengue datam de 610 d.C. sendo relatadas na enciclopédia chinesa denominada “*Encyclopedia of Disease Symptoms and Remedies*”, no qual os chineses as denominavam como “veneno da água”, pois associavam a causa da doença a insetos alados relacionados à água. Outros relatos da doença datam dos anos de 1779 e 1780 nos continentes asiático, africano e americano, onde ocorreram grandes epidemias similares à dengue (Gubler, 1998). Provavelmente, a palavra dengue se originou do termo “*Ki denga pepo*” do dialeto Swahili da região do Caribe, que significa súbito tremor de cãimbra causado por espírito mal. Essa expressão foi utilizada para descrever uma epidemia de enfermidade

febril ocorrida nessa região durante o século XIX entre os anos 1827 e 1828 (Halstead, 1980).

Nas Américas, os relatos de ocorrência de dengue são datados de mais de 200 anos. Porém, a primeira epidemia de dengue comprovada laboratorialmente nas Américas aconteceu em 1963/1964 na Venezuela e Região do Caribe, associada ao sorotipo DENV3 (Gubler, 2004). Atualmente, os quatro sorotipos de DENV estão presentes nas Américas, com ocorrência de hiperendemicidade (co-circulação de múltiplos sorotipos) em muitas regiões (Gubler, 2011). Além disso, a dengue é endêmica em mais de 100 países, com casos de DHF sendo relatados em mais de 60 países. Nos últimos anos, essa doença vem se expandindo, levando ao aumento do número de centros urbanos hiperendêmicos, do número de casos de FHD e consequentemente de morte (WHO, 2009).

De modo geral, a incidência da doença aumentou drasticamente na América do Sul e Caribe nas últimas décadas, continuando elevada na Ásia, principalmente no Sudeste Asiático. Além disso, diversos casos continuam sendo detectados na África e Austrália (Gubler, 2011). Já na Europa e América do Norte, a população estabelecida do vetor, juntamente com as viagens e migrações, também fornecem uma oportunidade de epidemias em uma população suscetível (Guzman & Istúriz, 2010; Gubler, 2011). Esse panorama pode ser observado na figura 1.2, onde somente o sudeste asiático na década de 70 apresentava a co-circulação dos 4 sorotipos virais. Passados 40 anos, encontramos circulando todos os sorotipos virais em toda faixa intertropical mundial (Gubler, 2011).

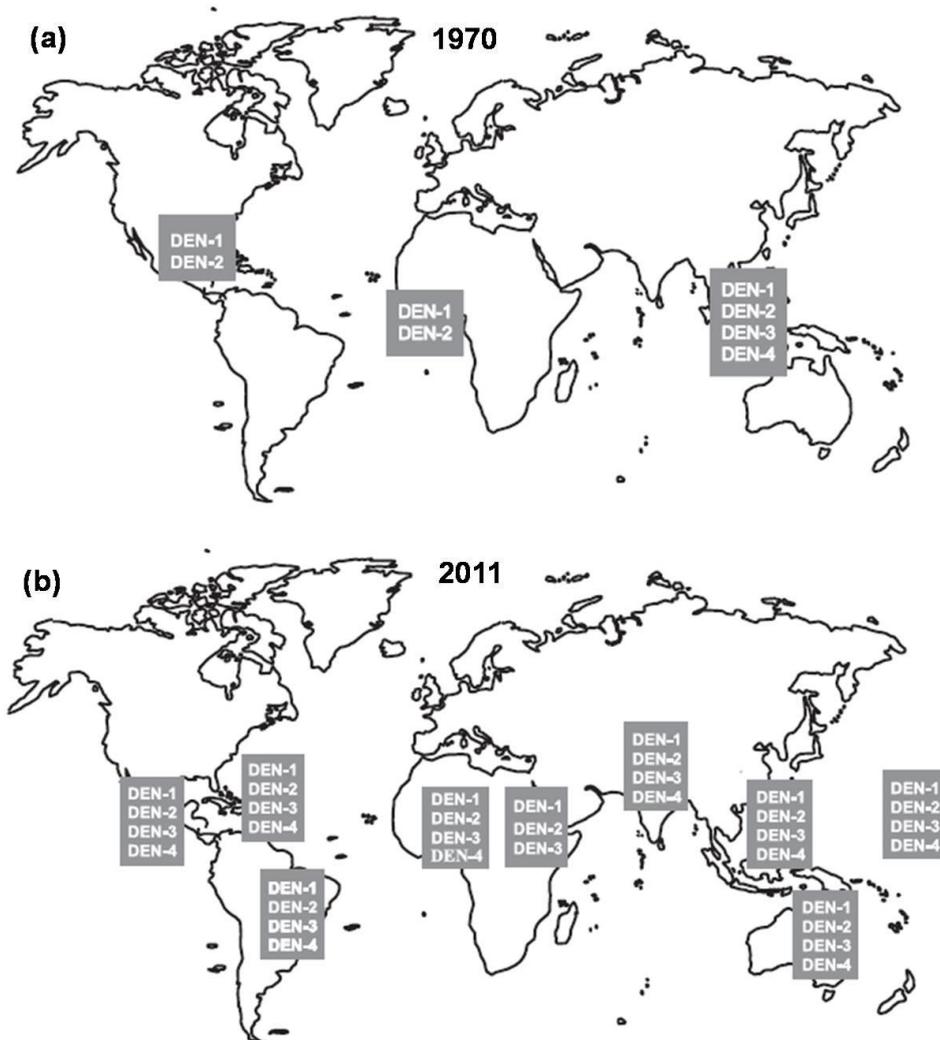


Figura 1.2: Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue: A figura mostra circulação do DENV no cenário mundial nos anos 70 (a) e 2011 (b). (modificado Gubler 2011).

1.2.2 No Brasil

No Brasil, desde 1846, há registros de casos de dengue e/ou de epidemias de síndromes comparáveis ao dengue em diferentes estados, como Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco (Meira, 1916; Figueiredo, 2000). Epidemias de dengue foram registradas no estado de São Paulo de 1851 a 1853 e em 1916; em Santa Maria, no Paraná, em 1917 (Reis, 1896). Entretanto, a primeira epidemia de dengue a ser documentada clínica e laboratorialmente no país, após a reintrodução e recolonização do *Ae. aegypti* em 1976, foi registrada em 1982 na cidade de Boa Vista, Roraima, com os sorotipos DENV1 e DENV4 (Osanai *et. al.*, 1983). Após essa epidemia, um novo surto de dengue foi registrado em 1986 na região sudeste, com os

primeiros casos ocorrendo no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro com o vírus DENV1 (Schatzmayr *et al.*, 1986), que logo se dissipou na direção norte-nordeste do Brasil. Quatro anos após a introdução do DENV1, em abril de 1990, um novo surto se iniciou no Rio de Janeiro e em Niterói, no qual o vírus DENV2 foi isolado pela primeira vez de casos autóctones (Nogueira *et al.*, 1990). Já em 2000, o sorotipo DENV3, foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, sendo isolado tanto do mosquito *Ae. aegypti* quanto de pacientes infectados em Nova Iguaçu (Nogueira *et al.*, 2001; Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 2002).

Nos anos de 2001 e 2002, registrou-se a maior epidemia do estado do Rio de Janeiro, com 368.460 casos, dos quais 177.919 apenas no município do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 2001; Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 2002; SESDEC-RJ, 2008). Desde 1982, quando o DENV4 foi encontrado pela primeira vez na cidade de Boa Vista, Roraima, não houve relato de epidemias com esse sorotipo no Brasil. Entretanto, em 2010, o DENV4 foi isolado a partir de casos detectados no estado de Roraima e no Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV4 no Rio de Janeiro foram confirmados pelo Instituto Oswaldo Cruz (Ministério da Saúde, 2011). Desde então, temos os 4 sorotipos em circulação no nosso país (Ministério da Saúde, 2013).

Cabe ressaltar que o Brasil tem experimentado diversas epidemias de dengue, desde 1977, contabilizando mais de 4.5 milhões de casos, destacando-se as regiões sudeste e centro oeste com os maiores números de notificação no ano de 2013 (Ministério da Saúde, 2013). O Ministério da Saúde considera três níveis de incidência de dengue: baixa (até 100 casos por 100 mil habitantes), média (de 101 a 300 casos) e alta (acima de 300). A média nacional é de 368.2 casos/100 mil habitantes. Nos três primeiros meses deste ano, 11 estados brasileiros apresentaram alta incidência de dengue e concentraram 74,5 % dos casos notificados ao Ministério da Saúde. De 1º de janeiro a 30 de março, os estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Tocantins, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás registraram índices que vão de 304.9 até 3.105 casos por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2013).

A circulação dos diversos sorotipos ao longo dos anos contribuiu para uma mudança do panorama atual da dengue no Brasil (fig.1.3). A partir de 2007, passou a ocorrer um aumento do número de casos mais graves da doença na faixa etária de até 15 anos, ao invés de acometer principalmente os adultos entre 20-40 anos como ocorria em anos anteriores. Isto se deve ao fato dos indivíduos mais velhos acumularem imunidade contra os sorotipos circulantes, e conseqüentemente a infecção afeta principalmente os mais jovens que ainda não entraram em contato com os vírus (Rodriguez-Barraquer *et.al.*, 2011).

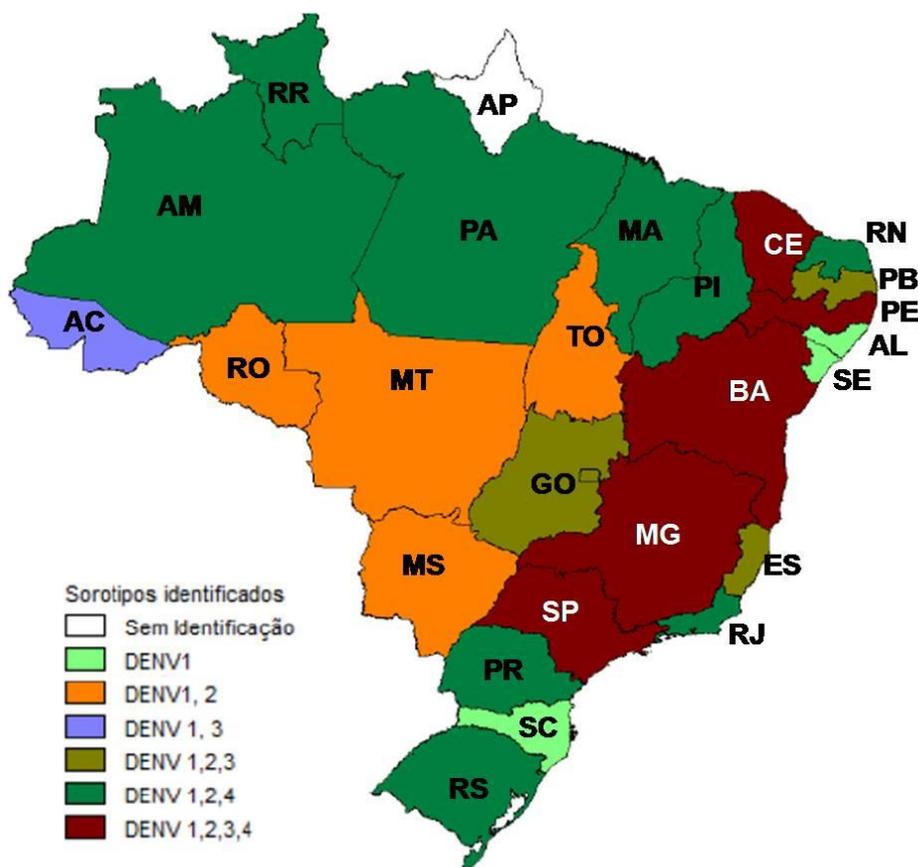


Figura 1.3: Sorotipos de Dengue isolados no Brasil por estado, janeiro-agosto 2011 (Brasil, 2011).

1.3 Ciclo de vida do vírus e transmissão

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas adultas de mosquitos do gênero *Aedes* transmitem o vírus da dengue ao hospedeiro humano. O ciclo de transmissão envolve a ingestão pelo mosquito de partículas virais circulantes no sangue periférico de um indivíduo e após um período de incubação, ocorre a transferência do vírus a outro indivíduo. O período de incubação no vetor

dura de 8 a 12 dias, necessários para que ocorra a replicação e disseminação viral na hemocele e em todos os tecidos do inseto, com a infecção final das glândulas salivares e a transmissão do vírus para um novo hospedeiro humano susceptível. O mosquito permanece infectado e assintomático durante toda a sua vida que é em torno de 30 dias, e é capaz de transmitir o vírus da dengue para diversas pessoas, devido à sua capacidade de se alimentar de múltiplos indivíduos em sucessão. Outra forma importante de transmissão que ocorre entre os mosquitos do gênero *Aedes* é a transovariana, em que o vírus da dengue é transmitido diretamente para a prole, dispensando o homem no ciclo mantenedor. O hospedeiro humano torna-se virêmico após um período de incubação de 3 a 14 dias, após a picada por um mosquito infectado, concomitante ao início do período febril (Rice, 1996; Gubler, 1998).

Após a picada do mosquito infectado no homem, o vírus entra em contato com as células dendríticas (células de Langerhans), que são os sítios iniciais da infecção, em seguida as mesmas migram para os linfonodos e outros órgãos linfóides. Neste momento há uma intensa participação dos macrófagos, ativados pelas células dendríticas, que migram para o sítio de infecção iniciando o processo de fagocitose (fig.1.4) (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005, Chaturvedi *et al.*, 2006)

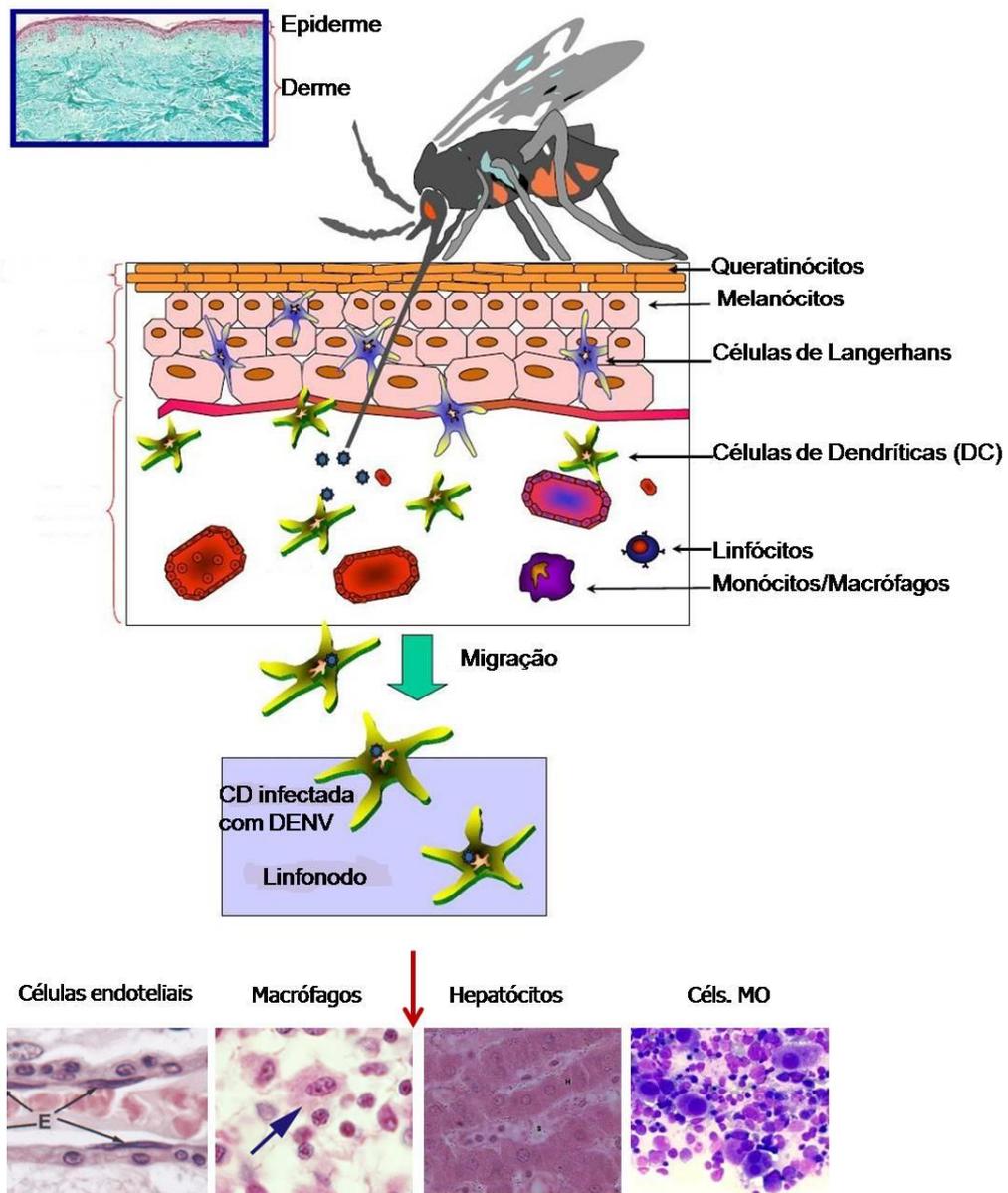


Figura 1.4: Representação esquemática da inoculação do DENV pelo mosquito vetor na pele do hospedeiro. A figura mostra o contato inicial do DENV com o hospedeiro. O vírus é inoculado pelo mosquito através da pele durante a sua alimentação. As células dendríticas são os principais alvos do vírus no primeiro momento da infecção pelo DENV. Estas células infectadas na derme migram para os linfonodos regionais ao mesmo tempo em que ocorre o seu processo de maturação. Em um segundo momento a replicação viral também passa a ocorrer em células endoteliais, macrófagos residentes de outros órgãos, hepatócitos, células da medula óssea, etc. CD = células dendríticas, MO = medula óssea (adaptado de Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

A entrada das partículas virais na célula hospedeira ocorre por endocitose mediada por receptor. Diversos receptores que interagem com as partículas virais já foram descritos, tais como: heparan sulfato, proteínas de choque térmico 70 (HSP70) e 90 (HSP90), GRP78/BiP, CD14, receptor de 37/67-kDa de alta afinidade pela laminina, L-SIGN e DC-SIGN (Clyde; Kyle &

Harris, 2006). Além das células dendríticas e macrófagos, outros estudos realizados em modelos animais ou com necrópsia de indivíduos que morreram de dengue apontam outros tipos celulares como alvo de replicação viral, como hepatócitos, células neuronais e endoteliais (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Clyde; Kyle & Harris, 2006, Paes *et al.*, 2009).

Os vírus são internalizados e no pH ácido do endossoma, a proteína E sofre mudanças conformacionais, passando do estado dimérico para trimérico, e expondo uma região (peptídeo de fusão) que é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana da vesícula. Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e o RNA viral participa de dois processos importantes durante a replicação: serve como RNA mensageiro para a síntese da poliproteína viral, que posteriormente é clivada gerando as proteínas estruturais e não-estruturais, e atua como fita molde para a síntese de fitas de RNA de polaridade negativa. Estes RNAs de polaridade negativa servirão, então, de molde para a síntese de novas fitas positivas que serão incorporadas às novas partículas virais e/ou participarão da tradução de mais poliproteínas. A montagem da partícula viral e sua maturação ocorrem no retículo endoplasmático e no complexo golgiense, sendo posteriormente exocitada (fig. 1.5). (Cleaves; Ryan & Schlesinger, 1981; Harris *et al.* 2006; Clyde; Kyle & Harris, 2006; Laughlin *et al.*, 2012; Stiasny & Heinz, 2012)

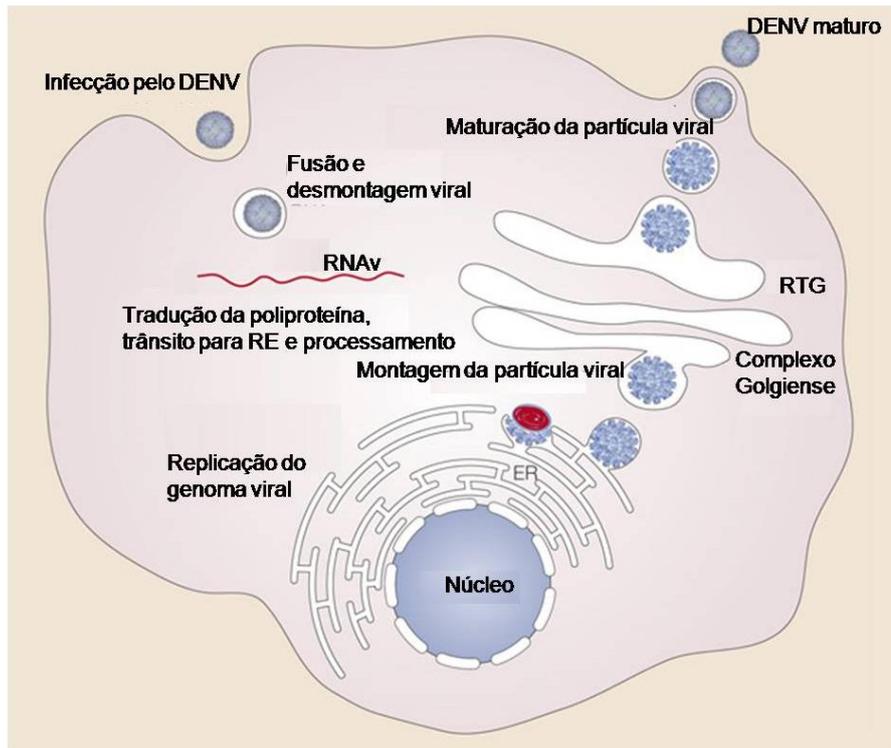


Figura 1.5: Ciclo de replicação do DENV. A entrada da partícula viral ocorre através da via endocítica mediada por receptores na superfície da célula alvo. No pH ácido do endossoma a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam à fusão das membranas viral e endossômica. Após a fusão, o RNAv é liberado para o citoplasma, é traduzido em uma poliproteína e inicia-se o processo de replicação. A poliproteína viral é processada e ocorre então a montagem de novas partículas virais no retículo endoplasmático. As novas partículas imaturas recém formadas seguem pela via de secreção e completam a maturação na rede trans-Golgi. Posteriormente, os vírus são liberados pela célula hospedeira prontos para a infecção de outra célula alvo. Adaptado de Mukhopadhyay *et al.*, 2005. RNAv = RNA viral; ER = retículo endoplasmático; RTG = rede trans-Golgi

1.4 Vírus da dengue

Os vírus da dengue são esféricos, com aproximadamente 50 nm de diâmetro e envelopados (Putnak, 1994; Kuhn *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2008). O envelope viral consiste em uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático, onde estão inseridas as proteínas do envelope e da membrana. Abaixo do envelope viral há um capsídeo de aproximadamente 30nm de diâmetro de formato icosaédrico, formado por várias subunidades da proteína do capsídeo, e complexado a uma molécula de RNA fita simples com polaridade positiva (fig. 1.2 a e b) (Lindenbach & Rice, 2001; Kuhn *et al.* 2002, 2008; Qi & Chi., 2008).

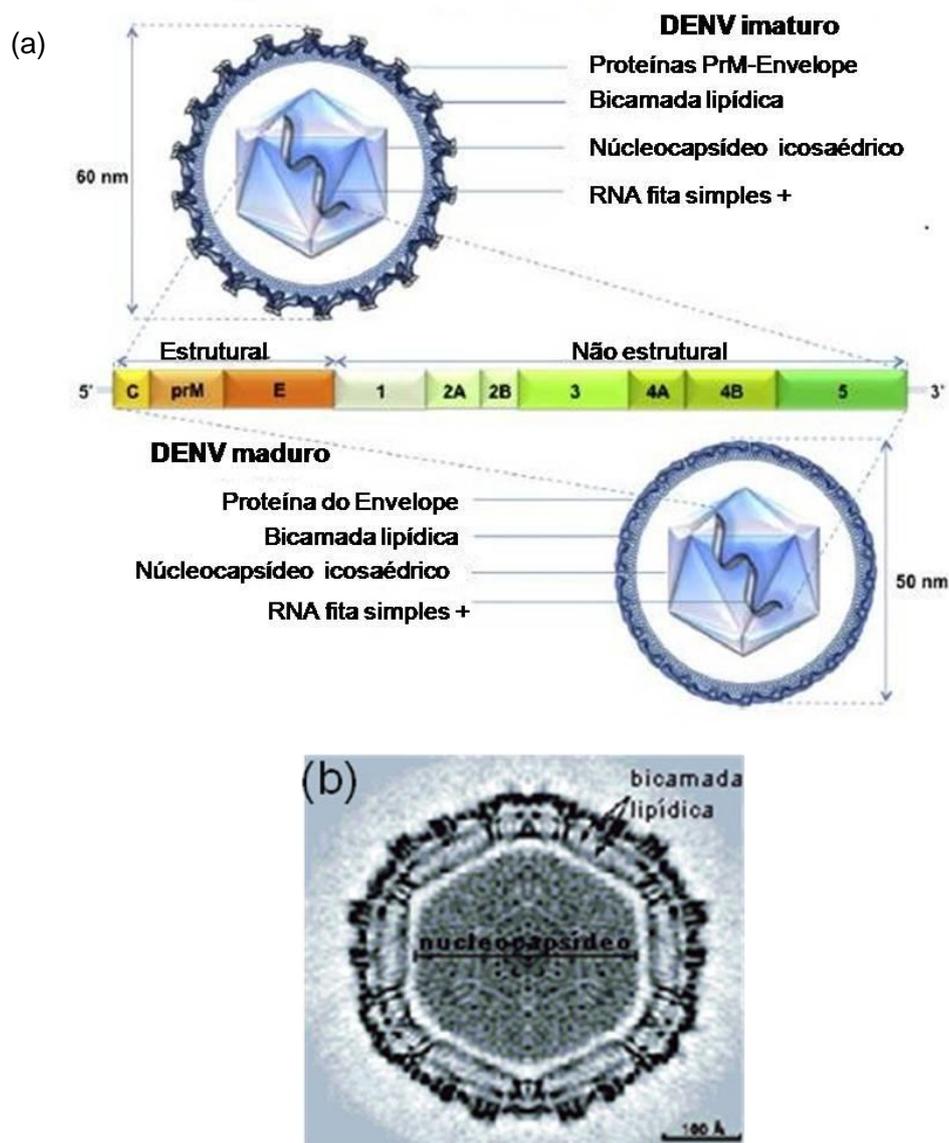


Figura 1.6: Estrutura e genômica do DENV. (a) A partícula viral do DENV contém genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva. O material genético é encapsulado em um nucleocapsídeo e envelopado em uma bicamada lipídica. O genoma viral codifica 10 proteínas virais: três estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A partícula viral imatura apresenta superfície glicoprotéica acidentada enquanto que as partículas virais maduras apresentam um envoltório glicoprotéico liso. C, capsídeo; E, envelope; prM, pré-membrana; NS, não-estrutural; ss-RNA, ácido ribonucleico de fita simples. (Adaptado de L.J. Herrero *et al.* 2013) (b) Imagem do vírus da dengue obtida por microscopia crioeletônica identificando a bicamada lipídica e o nucleocapsídeo. (modificado de Stiasny & Heinz, 2006 e Purdue University.).

O RNA viral, de aproximadamente 10,7 kb, é modificado em sua extremidade 5' pela adição da estrutura *cap*, mas é destituído de cauda poli-A na extremidade 3'. Este RNA compreende um único quadro de leitura aberto, que codifica a poliproteína precursora das proteínas flavivirais. Este precursor é clivado por proteases celulares e pela protease viral gerando as três proteínas

estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM), que quando clivada gera a proteína de membrana (M), e envelope (E), além das sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Umareddy *et al.*, 2007) (fig.1.7).

As proteínas estruturais são incorporadas às partículas virais durante sua maturação, enquanto as proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação e/ou montagem dos vírions. As regiões não-codificantes 3' e 5' também são importantes para replicação viral (Chamber *et al.* 1990; Kuhn & Rossmann, 2005; Qi *et al.*, 2008). Os sorotipos de DENV são geneticamente semelhantes, compartilhando aproximadamente 65 % de similaridade. Apesar disso, são antigenicamente distintos, devido principalmente às diferenças de 25-40 % na sequência de aminoácidos presentes na proteína E, onde estão localizadas as principais propriedades antigênicas do vírus (fig.1.8) (Guzman *et al.*, 2010).

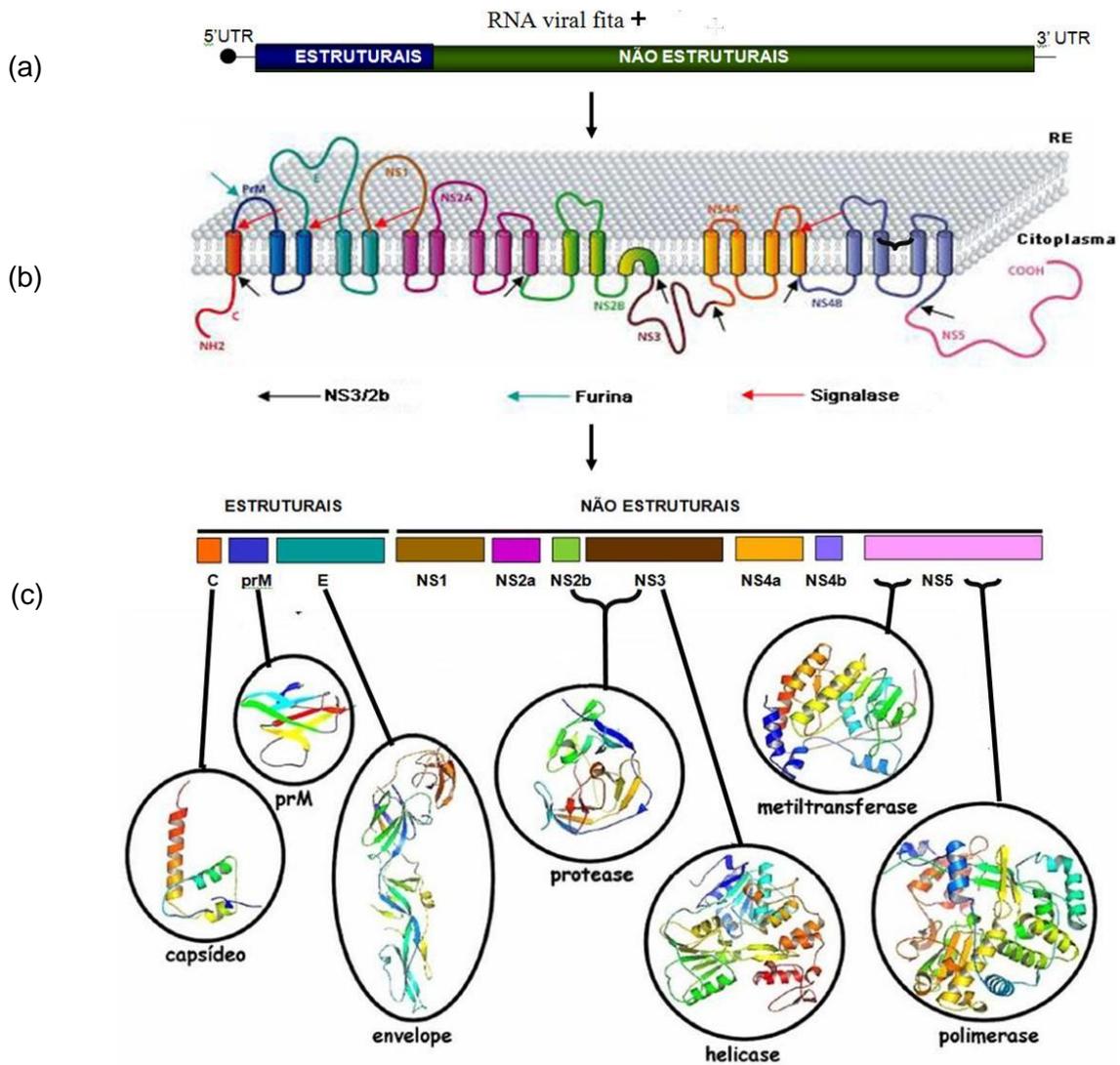


Figura 1.7: Representação esquemática da tradução e processamento da poliproteína viral. O genoma é constituído por um RNA fita simples com polaridade positiva e apresenta em sua extremidade 5' UTR uma estrutura denominada *cap* (a). A extremidade 3' UTR não contém uma cauda poliadenilada (a). O genoma do DENV possui apenas uma única fase aberta de leitura e sua tradução é direcionada para o RE gerando uma poliproteína precursora (b). Ao longo da sequência da poliproteína existem sítios de clivagens onde proteases, celulares e viral, atuam gerando, assim, 3 proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (c) Estrutura e função de algumas proteínas virais durante a fase de replicação. (modificado de Umareddy *et al.*, 2007 e Assenberg *et al.*, 2009).

1.5 Proteínas do vírus da dengue

A proteína C, altamente básica, possui cerca de 11 kDa e se associa ao RNA viral formando o nucleocapsídeo. Sua porção central contém domínios hidrofóbicos que interagem com membranas celulares, tendo um papel na montagem da partícula viral (Lindenbach & Rice, 2001).

A glicoproteína prM tem aproximadamente 26 kDa e funciona como chaperonina, impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais durante o seu trânsito por compartimentos ácidos na fase de maturação do vírus. A porção N-terminal desta proteína é clivada durante seu transporte pelo complexo golgiense, originando a proteína M, presente na partícula madura (Lindenbach & Rice, 2007; Stiasny & Heinz, 2012). Além disso, foi demonstrado que a interação de prM com a adenosina trifosfatase (ATPase) vacuolar é essencial para que ocorra a secreção de partículas virais (Duan *et al.*, 2008).

A proteína E tem peso molecular de cerca de 53 kDa e constitui o principal antígeno viral responsável por funções importantes, tais como: interação das partículas virais com receptores celulares, tropismo e fusão com membranas celulares (Chambers *et al.*, 1990, Lindenbach & Rice, 2007). Devido à sua interação com diferentes receptores celulares, esta glicoproteína tem o papel de mediar a endocitose da partícula viral (Suksapaisan, Susantad & Smith, 2009). Além disso, ela contém os principais epítomos que são reconhecidos por anticorpos neutralizantes, sendo assim um forte imunógeno (Lindenbach & Rice, 2001; Stiasny & Heinz, 2006). Além disso, muitos estudos têm relacionado diferentes graus de virulência e eficiência de replicação viral de determinadas cepas com mutações na proteína de E (Kawano *et al.*, 1993; Sánchez & Ruiz, 1996; Gualano *et al.*, 1998; Bordignon *et al.*, 2007). Após a internalização do vírus em vesículas na célula hospedeira e a acidificação deste ambiente, a proteína E passa do estado de dímero para trímero e expõe o seu peptídeo de fusão, responsável pela fusão das membranas do envelope viral e do endossoma, que leva à liberação do nucleocapsídeo e posteriormente, do RNA viral para o citoplasma (Lindenbach & Rice, 2007).

A função de diversas proteínas não-estruturais ainda não foi totalmente elucidada. A glicoproteína não-estrutural 1 (NS1) possui cerca de 45-48 kDa e é essencial para viabilidade do vírus da dengue. Alguns estudos sugerem que ela esteja envolvida nos estágios iniciais da replicação viral (Lindenbach & Rice, 1997; Lindenbach & Rice, 1999). Sabe-se que a proteína NS1 induz a produção de anticorpos (Valdés *et al.*, 2000), está associada à superfície da célula infectada e também é secretada para o meio extracelular no hospedeiro vertebrado (Chambers *et al.*, 1990). Pouco é conhecido sobre o papel desta proteína na infecção viral. Como a NS1 é o alvo deste estudo, que tem por

objetivo o mapeamento da resposta imune protetora gerada por uma vacina de DNA que leva à expressão desta proteína, suas possíveis características e funções serão exploradas com mais detalhes no item 1.4.2.

Quanto à NS2a, sabe-se que ela é um componente do complexo de replicação (Westaway *et al.*, 2003), além de existirem evidências de que ela desempenha papéis importantes na incorporação de RNA às partículas nascentes interage com a proteína NS3 no processo de formação da partícula viral (Kümmerer & Rice, 2002). A NS2b, por sua vez, atua como co-fator para a atividade proteásica da proteína NS3. A NS3 é a proteína não estrutural mais estudada dos flavivírus, uma vez que desempenha funções essenciais no ciclo dos mesmos e constitui um alvo potencial de terapias antivirais. Sabe-se que ela é multifuncional, com uma atividade de serina-protease exercida pelos 180 aminoácidos iniciais presentes na sua porção N-terminal, além de desempenhar outras três atividades: de helicase, RNA trifosfatase (RNTase) (Chambers *et al.*, 1990) e nucleotídeo trifosfatase (NTPase) (Clyde *et al.*, 2006), realizadas por sequências protéicas presentes na sua porção C-terminal. A NS3, juntamente com a NS2b, é responsável pela clivagem em sítios específicos da poliproteína viral, enquanto que a helicase auxilia no processo de síntese de novas moléculas de RNA viral (Clyde *et al.*, 2006).

Ainda não existem dados definitivos com relação à função das proteínas NS4a e NS4b. No entanto, a NS4A tem sido implicada como tendo um papel no rearranjo de membranas intracelulares que facilitaria a síntese do RNA e montagem da partícula viral (Perera & Kuhn, 2008). Já a NS4B interagiria com a proteína NS3, desempenhando um papel na replicação, além de bloquear a transdução de sinal induzida por interferon (IFN) α , β e γ (Perera & Kuhn, 2008), assim como a NS2A e a NS4A em menor grau (Muñozjordan *et al.*, 2003; Clyde; Kyle & Harris, 2006).

A proteína NS5 é a maior das dez proteínas dos flavivírus, com aproximadamente 104 kDa, e apresenta múltiplos domínios envolvidos no ciclo replicativo do vírus. Sua região N-terminal apresenta atividade metil-transferase, associada com a reação de adição de *cap* ao RNA viral, e a porção C-terminal possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela síntese de fitas negativas e positivas do RNA viral (Lindenbach *et al.*, 2007). As fitas negativas servem de molde para a síntese

de fitas positivas de RNA que são utilizadas para a tradução de novas poliproteínas ou seguem para a montagem do nucleocapsídeo das partículas virais (Lindenbach & Rice, 2001). Entre estas regiões, especula-se que um domínio central (320-405 aminoácidos) interaja com o núcleo da célula hospedeira, porém sem função determinada até o momento (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.5.1 A proteína NS1

A proteína não-estrutural (NS1) foi descrita inicialmente como antígeno solúvel de fixação de complemento (FCS) em cultura de células infectadas pelo DENV (Brandt *et al.*, 1970). O antígeno FCS foi reconhecido como uma glicoproteína de 45-48 kDa (gp46) (Smith & Wright, 1985), posteriormente, denominada como NS1 devido à sua grande analogia à NS1 do vírus da febre amarela (Rice *et al.* 1985). A NS1 contém cerca de 350 a 354 aminoácidos com 12 resíduos de cisteína e é razoavelmente conservada dentro do gênero *Flavivirus*. A NS1 está ausente na partícula viral e é sintetizada durante a replicação do vírus em monômeros que se organizam em dímeros e se associam à membrana plasmática na superfície das células infectadas (mNS1). Esta proteína também é secretada em grande quantidade para o meio extracelular como dímeros e hexâmeros (sNS1) (Winkler *et al.* 1989, Falconar & Young 1990, Lindenbach & Rice 2001, Muller & Young, 2013), sendo detectada em altas concentrações no soro de pacientes na fase aguda da infecção (Young *et al.*, 2000).

Durante a infecção, a NS1 é translocada pela via do retículo endoplasmático, utilizando como sequência sinal à região C-terminal da proteína E. Dentro do retículo endoplasmático, a NS1 é N-glicosilada em dois sítios conservados e, a seguir, sofre dimerização (Pryor & Wright, 1993). Além disso, nosso grupo confirmou que a porção N-terminal hidrofóbica da proteína NS2A é essencial para a associação da proteína NS1 à membrana da célula hospedeira (Costa *et al.*, 2007), que parece funcionar como sequência sinal para ligação via âncora glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Jacobs *et al.*, 2000).

A função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não foi totalmente esclarecida. Contudo, alguns artigos sugerem seu papel na formação do

complexo replicativo, desempenhando um papel essencial na replicação do RNA viral (Lindenbach e Rice, 1997,1999; Westaway *et al*, 1997; Khromykh *et al*, 2000, Muller & Young, 2013).

Como, durante a infecção viral, a NS1 é secretada em grande quantidade para o meio extracelular (Young *et al.*, 2000), a detecção desta proteína permite o diagnóstico da doença nos estágios iniciais da infecção. Alguns grupos têm avaliado o uso de NS1 nos ensaios de diagnóstico, mostrando que estes são bastante eficazes, com alta especificidade e sensibilidade (Chuansumrit *et al.*, 2008; Shu *et al.*, 2009; Zainah *et al.*, 2009; Castro-Jorge *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010).

Vários trabalhos sugerem que a NS1 pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento de dengue grave, pois os níveis elevados de NS1 circulante no soro parecem estar relacionados com os casos de FDH nos pacientes infectados (Libraty *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2012). No item 1.6.2 será abordada com mais detalhe a possível ação da NS1 na patogênese da dengue. Por outro lado, diversos trabalhos indicam que a proteína NS1 é um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue, por ser capaz de induzir uma forte resposta humoral durante a infecção viral (Schlesinger, Brandriss, & Walsh 1987; Henschal *et al.*, 1988; Schlesinger, Foltzer & Chapman, 1993, Libraty *et al.*, 2002). Em primo-infecção por dengue, baixos títulos de anticorpos IgM e IgG anti-NS1 são observados a partir de 2 e 9 dias, respectivamente (Huang *et al*, 1999; Shu *et al*, 2003, 2004). Em uma segunda exposição, ocorre um *booster* (reforço) desta resposta imune que resultará em um rápido aumento de anticorpos anti-NS1 durante a fase aguda da doença (Falkler *et al*, 1973;. Kuno *et al*, 1990, Churdboon-chart *et al*, 1991). Somado a esses trabalhos, nosso grupo demonstrou que vacinas de DNA baseadas na NS1 são capazes de induzir respostas imunes protetoras contra o vírus da dengue sorotipo 2 (Costa *et al.*, 2006a e b; Costa *et al.*, 2007).

Com base nessas informações, pode-se perceber a importância de uma melhor investigação sobre o papel da glicoproteína NS1 na infecção viral e seu envolvimento na proteção, visto que, qualquer vacina baseada na proteína NS1 deverá apresentar uma estratégia de formulação que assegure uma resposta imune eficiente sem riscos de desenvolvimento da doença.

1.6 A doença

A dengue é uma doença febril aguda causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (Edelman & Hombach, 2008) e resulta em um amplo espectro de manifestações clínicas, que, porém, podem variar em intensidade de acordo com as características do hospedeiro e do vírus, tais como: cepa e sorotipo viral, idade, estado imunológico e constituição genética do hospedeiro (Halstead, 1988, Monath, 1994; WHO, 1997; Ross, 2010, Gubler, 1998).

O período de incubação pode variar de 3 a 15 dias, mas dura em média de 4 a 7 dias, após o qual a infecção poderá evoluir para as seguintes formas clínicas: assintomática, indiferenciada ou oligossintomática, FD, FHD e a SCD (WHO, 1997).

A forma assintomática é a mais comum e estima-se que durante as epidemias ocorra um caso sintomático para cada cinco assintomáticos. A forma oligossintomática é a forma clínica moderada da doença e de difícil diagnóstico, pois a sintomatologia não é característica e se confunde com a de outras viroses, apresentando-se como uma febre indiferenciada, assemelhando-se a uma síndrome gripal (Souza *et.al.*, 2008b; BRASIL/Ministério da Saúde, 2005) ou hepatite (Souza *et.al.*, 2008a; Ling *et.al.*, 2007).

A febre clássica do dengue é caracterizada por febre de início súbito, cefaléia, dor retro-orbitária, fotofobia, bradicardia, exantema maculopapular, artralgia, mialgia, dor nos ossos, náusea, vômitos e fraqueza generalizada. Pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias, equimose, por exemplo, podem ser observadas em alguns casos. A FHD é caracterizada pela presença de petéquias, púrpura, equimoses e sangramentos em locais de picada de agulha. O teste do laço positivo indica o aumento da fragilidade capilar. Além disso, no hemograma observa-se trombocitopenia e hemoconcentração. A síndrome do choque da dengue (SCD), por sua vez, é caracterizada por taquicardia, ascite, efusão pleural, hipotensão e choque. Dor abdominal aguda e vômitos persistentes são indicações que a doença está progredindo para o choque. Muitas vezes essas duas síndromes cursam juntas (Brasil/Ministério da Saúde, 2005; Lai & Putnak, 2007). Existem relatos de manifestações neurológicas (Gubler & Trent, 1993; Miagostovich *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2004; Misra *et al.*, 2006) e hepatite (Ling; *et.al.*, 2007) em

pacientes com dengue. Entretanto, essa classificação é de difícil aplicação, já que, na prática, é raro que o doente se enquadre perfeitamente nos critérios preconizados pela OMS. O reconhecimento dessas limitações levou a OMS a financiar um estudo multicêntrico em sete países da Ásia e América Latina, e desta iniciativa nasceu um novo esquema de classificação (WHO, 2009, Narvaez *et al.*, 2011). A nova classificação divide as manifestações clínicas da dengue em: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave (tabela 1.1) Nesse novo critério, os sinais de alerta são determinados como: dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluido (ascite ou efusão pleural), sangramento de mucosas, letargia e hepatomegalia, além de trombocitopenia exacerbada (WHO, 2009).

Tabela 1.1: Classificação tradicional e a revisada da gravidade da dengue segundo a OMS (adaptado de Narvaes *et al.*, 2011).

Classificação da severidade da dengue segundo a OMS em 1997

Febre da dengue: Febre aguda com dois ou mais sintomas abaixo:

Dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, leucopenia, artralgia, *rash* e manifestações hemorrágicas (teste do torniquete positivo, petéquias, equimose, hematemesa, sangramento de mucosas ou do trato gastrointestinal e melena)

Febre hemorrágica da dengue (FHD): todos os sintomas abaixo:

Febre aguda ou histórico (2-7 dias), manifestações hemorrágicas, trombocitopenia e evidência de extravasamento plasmático

Síndrome do Choque da Dengue (SCD): FHD com hipotensão e pressão de pulso < 20 mmHg mais um dos sintomas abaixo :

Pulso rápido e fraco e pele fria e úmida

Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS em 2009

Dengue sem sinais de alerta: febre com dois dos sintomas abaixo

Náusea, vômito, *rash*, dores e teste do torniquete positivo

Dengue com sinais de alerta: a definição acima com um dos sintomas abaixo:

Dor abdominal , vômito persistente, acúmulo de fluídos clínicos, sangramento de mucosas, letargia, prostração, hepatomegalia e aumento de hematócrito com uma queda rápida da contagem de plaquetas

Dengue grave: pelo menos um dos parâmetros abaixo:

Extravasamento de plasma levando a: SCD, acúmulo de fluídos associados à dificuldade respiratória.

Comprometimento grave de órgãos:

- grande aumento dos níveis das enzimas hepáticas: AST ou ALT > 1000 U

- alterações de consciência, falha cardíaca e de outros órgãos.

1.6.1 Patogênese da dengue

Quando um indivíduo se infecta não é possível saber se ele desenvolverá formas mais leves ou evoluirá para FHD/SCD, pois os mecanismos patogênicos envolvidos na FHD/SCD são complexos e não estão claros. Vários mecanismos estão envolvidos na progressão da patogênese da dengue. Dentre eles destacam-se os fatores intrínsecos do hospedeiro (idade, susceptibilidade genética, resposta imune e doenças de base) e a variação genética e antigênica de diferentes cepas (revisito por Wan *et.al.*, 2013).

Existem extensas variações genéticas do DENV que possibilitam a classificação desse vírus em grupos denominados genótipos (Rico-Hesse, 1990). Uma teoria sugerida para explicar a patogênese da dengue é a da variação genética e antigênica de diferentes cepas virais. Este fator parece relacionar-se com o grau de severidade da doença na infecção primária, pois algumas cepas virais são consideradas mais virulentas que outras. Análises filogenéticas de DENV 2 indicam que enquanto cepas do genótipo americano estão associadas a quadros de febre do dengue, vírus pertencentes ao genótipo do sudeste asiático são mais virulentos e se correlacionam com os casos mais graves da doença (Holmes & Tiddy, 2003; Cologna, *et al.*, 2005; Stephenson, 2005; Kurane, 2007). Isto pode ser observado durante a introdução do DENV 2 genótipo asiático nas Américas que coincidiu com o aparecimento de dengue hemorrágica nestes países (Rico-Hesse *et al.*, 1997; Holmes & Twiddy, 2003; Kurane, 2007 Clyde; *et al.*, 2006).

O tropismo celular e tissular da cepa viral pode ter um grande impacto sobre o agravamento da doença. A detecção do DENV em diversos tecidos tais como baço, fígado, nódulos linfáticos, rim, medula óssea, pulmão, timo e cérebro, foi demonstrada em necropsias de casos fatais, e em modelos experimentais (Paes *et.al*, 2009, Martina *et al.*, 2009). Tais estudos mostram que o vírus pode se replicar nessas células como, por exemplo, macrófagos, células endotélias e hepatócitos desencadeando disfunções teciduais, levando ao agravamento da doença e ao óbito.

A patogênese engloba outros fatores, como a resposta imune do hospedeiro. Na infecção secundária, por exemplo, a fase crítica da doença ocorre quando a carga viral diminui, sugerindo que mecanismos imunológicos

como a resposta imune adaptativa, mediadores inflamatórios e fenômenos de auto-imunidade são importantes no desenvolvimento da patogênese da dengue (Wan *et.al.*, 2013)

Uma das possíveis explicações para o aumento de casos de FHD/SCD em infecções secundárias é o fenômeno conhecido como aumento da replicação viral dependente de anticorpos (ADE: do inglês, *antibody dependent enhancement*) (Halstead *et al.*, 1977,1988, 2007; Mathew & Rothman, 2008). Este fenômeno ocorreria após a primeira infecção com a geração de anticorpos específicos para aquele sorotipo (anticorpos homotípicos). Na infecção subsequente com um sorotipo diferente, estes anticorpos poderiam se ligar ao vírus, formando o complexo vírus-anticorpo que, além de não neutralizar a entrada do vírus nas células hospedeiras, favoreceria a opsonização da partícula viral, facilitando a infecção dos monócitos, macrófagos e células dendríticas. Neste processo, a porção Fc da molécula de IgG ligada ao vírus interage com receptores Fc γ nas células do hospedeiro, promovendo a fagocitose das partículas virais e aumentando a eficiência da infecção, resultando em um aumento dos níveis da replicação viral e de células infectadas (fig.1.8) (Halstead *et al.*, 1977,1988, 2007; Mathew & Rothman, 2008).

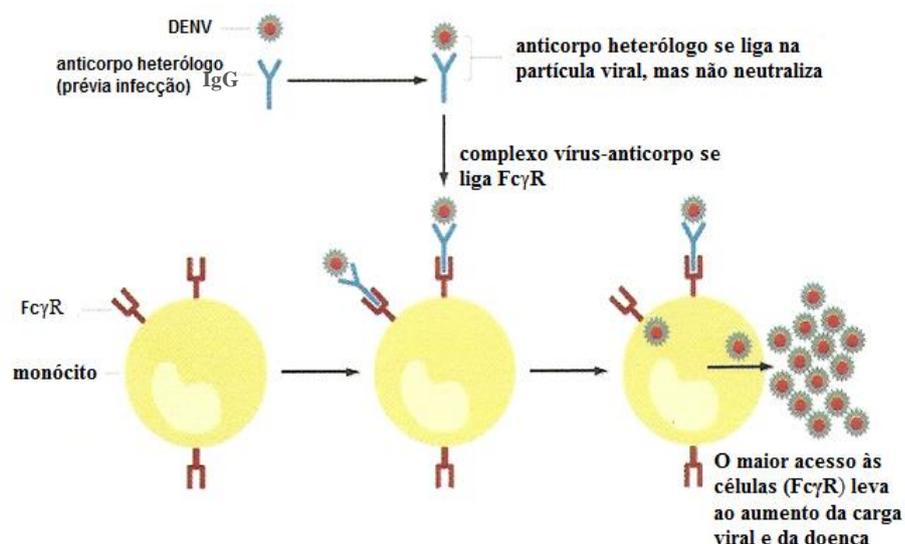


Figura 1.8: Representação esquemática do mecanismo de ADE: O aumento da replicação viral pelo mecanismo do ADE é hipotetizado ocorrer quando anticorpos não-neutralizantes heterotípicos de uma infecção anterior presentes no hospedeiro se ligam ao vírus durante uma infecção subsequente. Estes anticorpos que se ligam, porém não neutralizam a partícula viral, interagem com monócitos circulantes via receptor Fc γ R. O resultado final é o aumento do nível de viremia e da gravidade associada à doença (Modificado de Murphy & Whitehead, 2011).

Recentemente, uma nova hipótese, denominada ADE intrínseco, postula que a entrada do DENV mediada via receptor de Fc suprime a produção de IFN do tipo I e aumenta a produção de interleucina 10 (IL-10), direcionando para uma resposta T_H2. Esta resposta limitaria o efeito antiviral e aumentaria a produção de anticorpos. Segundo esta hipótese, anticorpos não-neutralizantes se ligariam ao vírus formando complexos capazes de produzir uma infecção produtiva em monócitos via receptor Fc, levando a modificações nos mecanismos antivirais da resposta imune inata e adaptativa (Halstead *et al.* 2010).

Outra teoria para explicar a patogenia da dengue grave em casos de infecções secundárias está relacionada com a resposta imune celular. Embora as células T de memória sejam capazes de reagir de forma cruzada contra sorotipos heterólogos do DENV, podendo assim prover imunidade protetora em infecções sequenciais, parte desta resposta vem sendo associada aos processos imunopatogênicos frente à infecção secundária (Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Basu & Chaturvedi, 2008; Martina *et al.*, 2009; Tan & Alonso, 2009; Nielsen, 2009; Murphy & Whitehead, 2011; Friberg *et al.*, 2011). A explicação para o agravamento da doença em casos de infecções secundárias seria a teoria do pecado original antigênico, que se baseia na reatividade cruzada de linfócitos T de memória gerados na primeira infecção. Em uma segunda infecção, esses linfócitos seriam ativados preferencialmente, ou seja, antes do estabelecimento de clones específicos contra o sorotipo circulante. Os clones heterólogos ativados apresentariam uma baixa afinidade ao sorotipo da infecção secundária, levando a uma resposta imune não eficiente, caracterizada por uma redução da atividade citotóxica e aumento de citocinas inflamatórias (fig.1.9) (Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006, Mathew & Rothman, 2008).

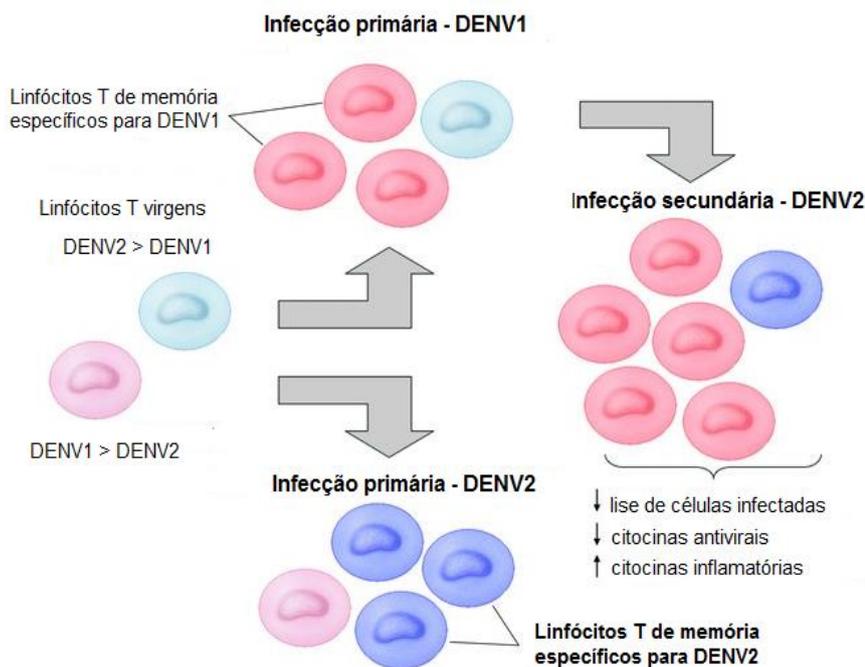


Figura 1.9: Representação esquemática do mecanismo proposto de reatividade cruzada em linfócitos T de memória. A infecção primária por DENV2 e as infecções sequenciais por DENV1 e DENV2 são comparadas. O repertório de células T virgens contém tanto células com maior afinidade para o DENV1 (rosa), quanto células com maior afinidade para DENV2 (azul). Durante a infecção primária, a população de células T com maior afinidade para o sorotipo infectante é preferencialmente expandida gerando células T de memória. Quando ocorrem infecções sequenciais, a população de células T de memória com maior afinidade para a primeira infecção é expandida mais rapidamente do que as células T virgens (adaptado de Rothman, 2004).

Diversos estudos indicam que ocorre um aumento significativo nas concentrações de mediadores imunológicos tais como citocinas durante a infecção pelo DENV. Esses mediadores desempenham papéis centrais na regulação da resposta imune à dengue (Wan *et.al.*, 2013). A perda da integridade das células endoteliais de um modo geral vem sendo associada à resposta imune anormal, com produção de altos níveis de citocinas, (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1, GM-CSF e IFN- γ), e tal efeito é chamado de “tempestade” ou “Tsunami” de citocinas (*citokine storm*), observada em pacientes com quadros graves da doença (Basu & Chaturvedi, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

Diversos estudos sugerem que a ativação do sistema complemento tem um papel na gravidade da doença. (Nishioka *et al.*, 1974; Shaio *et al.*, 1992). Níveis séricos da proteína sNS1 podem ativar a cascata do sistema complemento, criar imunocomplexos, e danos endoteliais, promovendo assim o extravasamento capilar (Avirutnan *et.al.*, 2006). Esses mecanismos

promoveriam a formação do complexo de ataque à membrana do sistema complemento (C5b-C9), desencadeando uma resposta celular com produção de citocinas inflamatórias (IL-8 e RANTES) e lise celular (Avirutnan *et al.*, 1998). Outro estudo indica que a proteína NS1 tem a capacidade de se complexar a protrombina no soro, inibindo sua ativação em trombina e, conseqüentemente, sua ação como coagulante (Lin *et al.*, 2012).

Estudos realizados por homologia de alinhamento de sequências, das proteínas capsídeo, E, PrM, e NS1 do DENV, têm mostrado diferentes níveis de similaridade de sequência com diferentes moléculas associadas à cascata de coagulação humana (fatores X, XI, IX, VII, II e plasminogênio, protombina e ativador de plasminogênio tecidual) (Lin *et al.*, 2011). Tais mecanismos podem desempenhar papéis importantes nas principais manifestações de FHD / SCD, incluindo hemorragia, trombocitopenia, extravasamento plasmático e hepatomegalia (Whitehorn & Simmons, 2011; Lin, *et al.* 2006; Lei *et al.* 2001, Wan *et al.*, 2013).

A presença de auto-anticorpos representa outro fator importante envolvido na patogênese da dengue (Lin *et al.* 2011). Os anticorpos produzidos durante a infecção por DENV podem apresentar reação cruzada com alguns auto-antígenos. Por exemplo, anticorpos que reconhecem epítomos lineares da proteína E interagem com o plasminogênio humano, inibindo a atividade da plasmina (Chungue *et al.* 1994., Huang, *et al.* 1997., Markoff, *et al.*, 1991.).

Além disso, vários estudos demonstram que anticorpos anti-NS1 reagem cruzadamente com hepatócitos, células endoteliais e plaquetas, o que levaria a um processo auto-imune (Falconar, 1997; Falconar, 2007; Liu *et al.*, 2011; Chang, *et al.*, 2002., Lin, *et al.* 2003., Oishi, *et al.*, 2003, Sun, *et al.* 2007), com o agravamento da doença na infecção secundária por outro sorotipo (Shu, *et al.* 2000, Libraty, *et al.* 2002). Outro trabalho sugere que o reconhecimento de células endoteliais por anticorpos direcionados contra NS1, levaria a um processo de apoptose induzida por óxido nítrico (Lin *et al.*, 2002). Os auto-anticorpos induzidos na resposta imune humoral de memória frente à infecção secundária com outro sorotipo também poderiam desencadear uma disfunção endotelial que levaria à hemorragia e extravasamento vascular da FHD/SCD (Sun *et al.*, 2007). Em um estudo utilizando modelo murino, Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2008) mostraram que a administração passiva de anticorpos anti-

NS1 gerados contra NS1 recombinante expressa em *Escherichia coli*, assim como a imunização direta com esta proteína, foram capazes de induzir danos em células endoteliais hepáticas, resultando em níveis séricos elevados das enzimas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) e infiltração de monócitos.

A ligação dos anticorpos às células hospedeiras também levaria à ativação do fator NF- κ B, resultando em uma resposta inflamatória com produção de IL-6, IL-8 e proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), e aumento da produção de molécula *de adesão* intercelular-1 (ICAM-1), que leva ao aumento da adesão de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (Lin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). Todos estes fatores teriam como resultado uma destruição vascular, levando a uma maior probabilidade do organismo de ter extravasamento de plasma e hemorragia.

Entretanto, na maior parte dos estudos que relatam a indução de anticorpos anti-NS1 que interagem com proteínas do próprio organismo, a proteína NS1 recombinante utilizada para obtenção dos anticorpos foi desnaturada, não sofrendo nenhum tratamento para seu re-enovelamento (Falconar, 1997; Lin, *et al.*, 2002). Portanto, os anticorpos gerados reconhecem predominantemente epítomos lineares presentes na proteína NS1. Além disso, um fato a ser considerado é a cinética de produção de anticorpos durante a infecção por DENV. Pouco se discute sobre o paradoxo entre a convalescença dos doentes e a persistência desses anticorpos. Por exemplo, a recuperação dos pacientes com graves sintomas de extravasamento vascular não coincide com uma queda de anticorpos circulantes (Mairuhu *et al.*, 2004). Ao contrário, é justamente no período de convalescência que os níveis de anticorpos anti-NS1 se encontram mais elevados (Muller & Young, 2013). Além disso, pacientes pediátricos com FHD/SCD em infecções primárias não apresentam níveis elevados de anticorpos anti-NS1 circulantes durante a fase aguda da doença (Muller & Young, 2013).

Outros fatores também poderiam estar envolvidos nas bases fisiopatológicas da doença. Doenças pré-existentes nos pacientes com dengue, como por exemplo, asma brônquica, anemia falciforme e diabetes, parecem contribuir para os quadros graves (Guzman & Kouri, 2008). Alguns polimorfismos encontrados em genes que fazem parte do complexo de

antígenos leucocitários humanos (HLA) (*human leukocyte antigen*) ou em genes não HLA também foram relacionados à susceptibilidade ou à gravidade de infecções com DENV (Chaturvedi *et al.*, 2006; Vejbaesya *et al.*, 2009). Assim sendo, o desfecho clínico parece ser o resultado de uma combinação de fatores tanto virais quanto do hospedeiro.

1.7 Modelos experimentais

Um grande obstáculo no estudo da dengue é a ausência de um modelo experimental que reproduza a doença como ocorre em humanos, com as suas diversas manifestações (Rothman, 2003). Além de não mimetizar as características fisiopatológicas da doença humana, os modelos animais empregados atualmente utilizam inóculos com cargas virais elevadas, aparentemente inconsistente com o que é observado durante a infecção humana (Green & Rothman, 2006).

Várias tentativas têm sido descritas para o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da infecção pelo DENV. A utilização de primatas não humanos devido à proximidade evolutiva com os humanos normalmente é escolhida para testes de vacinas contra flavivírus, nas etapas finais dos ensaios pré-clínicos. No entanto, além das dificuldades financeiras e éticas, esses animais não demonstram os sinais clínicos da doença, como observado em humanos, sendo avaliada principalmente a detecção de viremia, a resposta de anticorpos e trombocitopenia induzida após uma infecção secundária (Halstead *et al.*, 1973a, b; Bente & Rico-Hesse, 2006).

Por outro lado, os modelos murinos são amplamente utilizados para se estudar a infecção, a patogênese e os mecanismos envolvidos na doença, embora nenhum seja capaz de mimetizar o espectro completo da dengue. As linhagens mais utilizadas são BALB/c e C5BL/6, que podem ser infectados com DENV por diferentes vias de inoculação tais como: intravenosa (i.v), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) ou subcutânea (s.c). Tais modelos foram capazes de induzir alguns dos efeitos da infecção similares aos observados em casos de FD/FHD (Paes *et al.*, 2005, 2009; Chen *et al.*, 2004, 2007; de Oliveira França *et al.*, 2010). Um exemplo é o uso de camundongos C5BL/6 infectados com uma linhagem de DENV2 adaptada (Atrasheuskaya *et al.*, 2003) pela via i.p., sendo capaz de reproduzir sinais clínicos semelhantes aos observados em

casos de FHD/SCD, tais quais trombocitopenia, aumento da permeabilidade vascular, linfopenia, aumento de transaminases e citocinas pró-inflamatórias e provocando a morte de 80 % dos animais infectados (Guabiraba *et al.*, 2010). A alternativa é a utilização de camundongos imunodeficientes, *knockout* ou humanizados (revisado por Yauch, 2008). Esses modelos são úteis na investigação de mecanismos envolvidos na infecção pelo vírus da dengue e da patogênese. No entanto, a utilização destes animais pode constituir um problema quando se pensa em testes de vacinas profiláticas ou drogas terapêuticas, uma vez que a resposta imune induzida nesses modelos não é a mesma que a observada em camundongos do tipo selvagem e imunocompetentes, podendo levar a conclusões erradas sobre a eficácia e/ou potência de tais medicamentos (Chen *et al.*, 2004, Bente *et al.*, 2005; Yauch & Shresta, 2008).

Outro modelo amplamente utilizado é o do vírus neuro-adaptado a camundongos que ocasionando encefalite e morte dos animais (Patey *et al.*, 1993; Lum *et al.*, 1996). Contudo, algumas conclusões geradas com estes trabalhos são passíveis de críticas, pois os estudos não são realizados com os vírus que circulam na população humana e, além disso, a via de inoculação i.c. não é a via de infecção natural que ocorre em humanos (Patey *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2000, Atrasheuskaya *et al.*, 2003, Bente & Rico-Hesse, 2006).

Embora os sintomas apresentados nos animais inoculados com DENV por via i.c. não sejam exatamente os mesmos observados em humanos, existem evidências que indicam o envolvimento do sistema nervoso central na patogenia da dengue. Na literatura encontramos relatos de quadros de encefalite fatal, com a detecção de RNA ou antígenos virais no tecido cerebral dos indivíduos que sucumbiram à infecção (Miagostovich *et al.*, 1997, Soares, *et al.* 2011). Assim sendo, em nosso estudo utilizamos esse modelo para a realização do desafio, por ser amplamente utilizado para testar vacinas contra o DENV, além do que, nos permite comparar com outros estudos (Kochel *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998; Jimenez *et al.*, 2001; Caufour *et al.*, 2001; Clements *et al.*, 2010;).

1.8 Resposta imune

A infecção com um dos quatro sorotipos do DENV induz imunidade duradoura, provavelmente por toda vida, contra o sorotipo infectante (imunidade homotípica). Apesar da geração de resposta imune cruzada entre os sorotipos heterólogos que pode ser protetora, esta resposta é de curta duração (alguns meses) (Murphy & Whitehead, 2011). Sendo assim, naturalmente ocorrem infecções sequenciais com os diferentes sorotipos virais, principalmente nas regiões hiperendêmicas, onde há co-circulação de vários DENV (Laoprasopwattana *et al.*, 2007; Yauch *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011).

A primeira linha de defesa contra o DENV provavelmente tem início com a produção de interferons (IFNs) (Ho *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010), que parecem ser cruciais para a proteção, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, frente à infecção viral (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Além disso, foi observada a ativação de células *natural killer* (NK), que podem secretar várias citocinas incluindo o IFN- γ , principalmente em pacientes que apresentaram quadros leves de dengue, sobretudo durante os eventos iniciais da doença, antes do estabelecimento da resposta imune adaptativa (Azeredo *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral se inicia aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado com DENV (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Na infecção primária, inicialmente ocorre um aumento dos níveis de imunoglobulinas (Ig) M (IgM) específicas para antígenos de DENV, que geralmente persistem no soro dos indivíduos por 30-90 dias. A partir do décimo dia de infecção há um aumento dos níveis IgG específicas, que podem ser detectadas por muitos anos em indivíduos com histórico de dengue (Guzman *et al.*, 2010; Nagesh *et al.*, 2011). Em contrapartida, na infecção secundária ocorre um rápido aumento nos títulos de IgG, enquanto que a resposta de IgM surge posteriormente e em baixos níveis (Nagesh *et al.*, 2011; Murphy & Whitehead, 2011). Portanto, a análise do perfil da resposta de anticorpos (IgM e IgG) em pacientes com dengue pode contribuir para o diagnóstico de infecções primárias ou secundárias (Murphy & Whitehead, 2011).

A maioria dos anticorpos é direcionada contra as proteínas estruturais E e prM/M e contra proteína não estrutural NS1 (Kinney & Huang, 2001). A

proteína E se apresenta como um forte imunógeno que induz anticorpos com grande capacidade neutralizante, bloqueando a ligação da partícula viral às células alvo e a fusão das membranas viral e endossômica, abortando assim o estabelecimento da infecção (Whitehead *et al.*, 2007; Murphy & Whitehead, 2011; Julander *et al.*, 2011). Anticorpos contra as proteínas NS não neutralizam a infectividade viral diretamente, porém podem proteger através de outros mecanismos efetores (Kurane *et al.*, 1984; Pierson & Diamond, 2008). Anticorpos anti-NS1 são capazes de mediar a lise de células infectadas através da ativação de proteínas do complemento, uma vez que a proteína NS1 se apresenta associada à superfície de células infectadas com DENV (Miller, 2010, Avirutnan *et al.*, 2006). A presença de outras imunoglobulinas, tais como, IgA e IgE, em soros de pacientes com dengue também tem sido observada, porém pouco se sabe a respeito do envolvimento desta resposta imunológica (Talarmin *et al.*, 1998; Groen *et al.*, 1999; Koraka *et al.*, 2001).

A resposta imune celular ocorre principalmente sob estímulo da proteína NS3 e em menor escala das proteínas E e NS1 (Chambers *et al.*, 1990; Kurane *et al.*, 1992). Os linfócitos T podem participar ativamente na resposta imune protetora, reduzindo o número de células infectadas com o vírus e conferindo, portanto, proteção contra reinfecção (Libraty *et al.*, 2002).

Os linfócitos T auxiliares atuam na presença das células infectadas com DENV que expressam receptores de antígenos HLA tipo II, produzindo IFN- γ , IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF). Por outro lado, os linfócitos T citotóxicos levam à lise das células infectadas pelos DENV, que expressam receptores HLA tipo I (Monath, 1994). Alguns estudos, tanto com células de pacientes com dengue quanto com animais, demonstraram que a infecção por DENV induz uma resposta imune celular de memória específica e os clones de memória gerados são capazes de reagir contra epítomos homólogos e heterólogos de DENV (van der Most, 2000; van der Most *et al.*, 2003; Bashyam *et al.*, 2006; Mathew & Rothman, 2008; Basu & Chaturvedi, 2008; Friberg *et al.*, 2011).

A infecção primária por DENV, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, promove o desenvolvimento de resposta de células TCD4⁺ e TCD8⁺, específica contra epítomos das proteínas virais (Mathew & Rothman, 2008; Yauch *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Além disso, foi

demonstrada a participação das células TCD8⁺ no controle inicial da infecção por DENV (Yauch *et al.*, 2009).

1.9 Vacinas contra a dengue

A dengue é hoje um problema de saúde global em expansão e, portanto, o desenvolvimento de uma vacina tetravalente eficaz contra estes vírus é considerado uma alta prioridade de saúde pública. Entretanto, a singularidade dos vírus dengue e o espectro da doença resultante da infecção têm dificultado o desenvolvimento da vacina (Thomas & Endy, 2011).

Embora a imunidade homotípica ocorra ao longo da vida após a infecção com um sorotipo DENV, um fator de risco para o desenvolvimento de DHF / SCD são infecções heterólogas com os outros sorotipos (Halstead, 1982; Sangkawibha *et al.* 1984). Conforme já discutido no item 1.6.1, uma hipótese amplamente aceita é de que esta patologia seja causada por reações imunológicas, tais como reatividade cruzada com as células T e aumento da replicação viral dependente de anticorpo (Halstead, 1977, Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Portanto, um desafio para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue é que esta deve induzir imunidade contra os quatro sorotipos. Apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, atualmente não há vacinas licenciadas disponíveis para combater a dengue.

Entre os candidatos vacinais podemos citar as vacinas quiméricas construídas a partir do “esqueleto” de vírus atenuados, tanto do DENV quanto do vírus vacinal da Febre Amarela (Beaumier *et al.*, 2013). Além dessas, outras estratégias promissoras incluem vacinas de subunidades, outros vírus recombinantes expressando proteínas de DENV e as vacinas de DNA (Lazo *et al.*, 2007; Clements *et al.*, 2010; Khanam *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b, Costa, 2007, Costa, 2012, Azevedo, 2011, Azevedo 2013). Atualmente, existem várias vacinas em desenvolvimento em múltiplas plataformas que estão sendo testadas em ensaios clínicos, como mostra a tabela 1.2.

Tabela 1.2: Vacinas contra dengue em ensaios clínicos (adaptado de Beaumier *et al.*, 2013)

Candidato à vacina	Organização	Estagio de Desenvolvimento	Plataforma de produção
TDEN	USAMRMC	Teste clínico-Fase 1	Viva atenuada
DENVax	CDC/Inviragen	Teste clínico-Fase 1	Quimérica viva atenuada
TV	Sanofi Pasteur	Teste clínico-Fase 3	Quimérica viva atenuada
TDENV- PIV	WRAIR/GSK	Teste clínico-Fase 1	Vírus purificado inativado
TDENV1 PIV	WRAIR	Teste clínico-Fase 1	Vírus purificado inativado
HBV-001 D1	Merck &Co.	Teste clínico-Fase I	Proteína recombinante
TetraVax-DV	NIH/Biotec/Butatan/Vabiotec	Teste clínico-Fase I e II	Viva atenuada, vetor DENV4Δ30
TVDV	NMRC/Vical	Teste clínico-Fase I	DNA

Abreviaturas: CDC, Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos); DENV1 PIV, vacina monovalente com DENV1 inativado e purificado; GSK, GlaxoSmith-Kline; IDRI, Infectious Disease Research Institute; (Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas); NIH, National Institutes of Health; (Institutos Nacionais da Saúde); NMRC, Naval Medical Research Center; (centro naval de pesquisa médica); USAMRMC, United States Army Medical Research and Materiel ; WRAIR, Walter Reed Army Institute of Research.

1.9.1 Vacinas vivas atenuadas contra a dengue

Na década de 40 do século passado, Albert Sabin desenvolveu uma vacina de vírus vivo atenuado (LAV, do inglês: *live attenuated virus vaccine*) a partir de passagens do DENV1 (cepa Hawaii) em cérebros de camundongo. Tal vacina foi testada em alguns voluntários, mas logo seu processo foi descontinuado por não conferir proteção e apresentar diversos efeitos adversos (revisado por Raviprakash *et al.*, 2009). A partir de 1971, a Universidade do Havaí em colaboração com a WRAIR (*Walter Reed Army Institute of Research*)

desenvolveu outras LAVs, porém, ainda baseadas na atenuação viral empírica obtida por passagens em cultura primária de células de rim de cachorro. Concomitantemente, a Universidade de Mahidol (Bangkok, Tailândia), com apoio da OMS, produziu LAVs por passagens em células de rim de cachorro (PDK) (revisado por Guy & Almond, 2008 & Raviprakash *et al.*, 2009). Coletivamente, tais pesquisas resultaram em várias vacinas candidatas, monovalentes e tetravalentes, que foram avaliadas em ensaios clínicos. Contudo, foram observadas algumas complicações envolvendo alta reatogenicidade ou baixa imunogenicidade, além de interferência viral entre os componentes da mistura tetravalente (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001; Edelman, 2007; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011, Beaumier *et.al.*, 2013).

Outra vacina viva atenuada para dengue que entrou em fase clínica foi desenvolvida pelo WRAIR, em parceria com a GlaxoSmith Kline (GSK). Nesta vacina as cepas dos vírus vivos foram atenuadas pela passagem seriada em uma linhagem primária celular de rim de cão. Vários ensaios de fase 1 ocorreram para selecionar candidatos para formulação de uma vacina tetravalente, que foi denominada TDEN (Beaumier *et.al.*, 2013).

1.9.2 Vacinas quiméricas vivas atenuadas.

A Sanofi Pasteur em colaboração com a antiga Acambis desenvolveu quatro vacinas quiméricas febre amarela (FA) -dengue designadas ChimeriVax™ - DEN1-4 (CVD1-4), a partir da LAV, YF17D. A vacina YF17D foi produzida a partir do processo de atenuação do vírus da febre amarela, cepa Asibi, submetida a passagens seriadas em tecidos de embriões de galinha (revisado por Monath *et al.*, 2007). Desde 1936, a vacina YF17D vem sendo amplamente utilizada no mundo inteiro e a partir desta, surgiram subcepas vacinais como a vacina YF17DD (passagens 287-289). Sendo assim, alguns grupos, incluindo a Sanofi Pasteur e o grupo de BioManguinhos, construíram vacinas monovalentes FA-dengue com a substituição dos genes prM e E do vírus vacinal (YF17D) por genes prM e E de cada sorotipo do DENV separadamente (Guirakhoo *et al.*, 2001; Caufour *et al.*; 2001; Galler *et al.*, 2005). Os estudos clínicos mais avançados no desenvolvimento de uma vacina

contra a dengue são os que estão sendo realizados com a vacina da Sanofi Pasteur. Os resultados demonstraram que uma dose da vacina tetravalente induziu níveis variados de anticorpos neutralizantes (de baixos a moderados) contra os 4 sorotipos do DENV. Houve claramente um desequilíbrio na resposta imune induzida, sendo que as vacinas contra DENV2 e DENV4 (CVD2 e CVD4, respectivamente) se mostraram mais imunogênicas em relação aos outros componentes vacinais. Resultados semelhantes foram observados anteriormente em testes pré-clínicos conduzidos em primatas não-humanos (Guirakhoo *et al.*, 2004; Murphy & Whitehead, 2011). Por outro lado, essa vacina tetravalente foi capaz de gerar uma resposta imune mais homogênea contra os quatro sorotipos após o fim do protocolo vacinal, constituído de três doses administradas com intervalo de 6 meses (Murphy & Whitehead, 2011). Evidentemente, há críticas nesse protocolo de vacinação com duração de mais de um ano, o que não se deseja para regiões endêmicas, onde a imunização ineficiente para um ou mais sorotipos virais durante este período pode aumentar os riscos do desenvolvimento de casos mais graves da doença, mimetizando um quadro de infecções sequenciais. Recentemente, os resultados obtidos no ensaio de fase 2b quanto à eficácia desta vacina em Ratchaburi, na Tailândia, demonstrou uma proteção variada entre os vários sorotipos. Neste estudo, foi observado que as crianças não estavam protegidas contra DENV2, apesar de apresentarem níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra este sorotipo (Sabchareon *et al.*, 2012 a e b).

Outra vacina quimérica está em desenvolvimento pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH do inglês *National Institute for Health*), nos Estados Unidos, em colaboração com a Universidade Johns Hopkins. Esses grupos desenvolveram vacinas vivas atenuadas para dengue usando mutagênese dirigida, com a deleção de 30 bases na região 3' não traduzida de alguns DENV, e a substituição dos genes prM e E destes vírus por genes de outros DENV (Durbin *et al.*, 2006a e b; Blaney *et al.*, 2004). Diferentes vacinas monovalentes contendo DEN1 Δ 30, DEN2/4 Δ 30, DEN3/4 Δ 30 ou DEN4 Δ 30 foram testadas para a verificação da atenuação e imunogenicidade em modelos animais e humanos (Murphy & Whitehead, 2011). As construções consideradas mais promissoras nestes ensaios foram combinadas e formuladas em cinco vacinas tetravalentes, conhecidas como TetraVax-DV, e estão em fase 1. No entanto,

vale ressaltar o risco potencial de reversões ou recombinações gênicas encontradas em vacinas atenuadas que podem levar à quadros de infecções graves (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001; Murphy & Whitehead, 2011).

O CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) nos Estados Unidos também vem desenvolvendo uma vacina quimérica contra a dengue, DENVax, que foi licenciada para a Inviragen, Inc. Esta vacina usa uma cepa atenuada DENV2 e com a substituição dos genes prM e E dos outros sorotipos de DENV. Esta cepa foi atenuada por passagem seriada em linhagem de células primárias de rim de cachorro (Thomas & Endy, 2011, Beaumier *et al.*, 2013). O ensaio de fase 1 da DENVax foi concluído em St. Louis, Missouri, e outro um ensaio de fase está em curso na Colômbia. Dois outros ensaios clínicos de fase 1 estão em andamento, com recrutamento no Colorado, Utah e Texas, e outro na Colômbia, Porto Rico, Cingapura e Tailândia (Beaumier *et al.*, 2013). Os resultados obtidos destes estudos ainda não estão disponíveis.

Outra plataforma de vírus quiméricos são os vetores adenovirais que têm a capacidade de expressar múltiplos antígenos, o que teoricamente facilita o desenvolvimento de vacinas multivalentes. Sendo assim, foram construídas várias vacinas baseadas nesses vetores utilizando genes que codificam as proteínas estruturais e não estruturais de DENV (Holman *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2009; Khanam, 2009). Essas vacinas foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e resposta celular específica, no entanto, os animais vacinados não se mostraram totalmente protegidos, apresentando baixa viremia quando desafiados com DENV. Além disso, frequentemente se discute sobre o problema da população humana ter imunidade prévia contra esses vetores, uma vez que tal imunidade eliminaria rapidamente a vacina recombinante, antes de a mesma gerar a resposta imune esperada (Raviprakash *et al.*, 2009). Por outro lado, outros vetores virais, como o MVA (do inglês: *modified vaccinia Ankara*) ou VEE (do inglês: *venezuelan equine encephalitis vírus*) estão sendo usados na construção de vacinas contra dengue, já que a população humana não possui anticorpos contra estes vetores (Chen *et al.*, 2007; Raviprakash *et al.*, 2009).

1.9.3 Vírus inativados e purificados

A GSK em parceria com o WRAIR está agora buscando uma vacina tetravalente usando variantes purificadas dos vírus inativados, conhecido como TDEN-PIV. Estas vacinas são produzidas por crescimento do vírus em células VERO, seguido de inativação por formalina, e então formulada com adjuvantes alúmen ou um adjuvante da GSK. Esse processo de inativação resultou em perda da imunogenicidade quando comparado com as vacinas vivas atenuadas, pois apesar de induzir títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos e primatas não-humanos, tal vacina não foi capaz de proteger completamente os macacos, que apresentaram viremia após o desafio com DENV (Putnak *et al.*, 1996; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Além disso, foi constatada a necessidade de múltiplas doses de reforço da PIV para gerar proteção, o que torna mais difícil seu uso quando se pensa em áreas hiperendêmicas (Murphy & Whitehead, 2011). Mesmo assim, vários estudos pré-clínicos vêm sendo realizados com a PIV, testando adjuvantes e outras vacinas em sistemas de dose e reforço (*prime-booster*) (Putnak *et al.*, 2005; Raviprakash *et al.*, 2009). Um ensaio de fase 1 está recrutando voluntários para testar a vacina TDEN-PIV com os adjuvantes AS03B AS01E em Porto Rico e em Maryland (Beaumier *et al.*, 2013). Além disso, WRAIR tem um estudo de fase 1 em andamento para testar uma vacina monovalente purificada inativada de DENV1 em Maryland (Beaumier *et al.*, 2013).

1.9.4 Vacinas de Subunidade

Outros grupos têm investido na produção de vacinas de subunidades baseadas principalmente na proteína E ou no seu domínio III, nas proteínas NS1 e C (Lazo *et al.*, 2007; Clements 2010; Block *et al.*, 2010, Guzman *et al.*, 2010; Murphy & Whitehead 2011). Entretanto, múltiplas doses com ou sem adjuvantes são requeridas para indução de proteção (Kochel *et al.*, 1997; Murphy & Whitehead, 2011). Atualmente, está sendo realizado um ensaio clínico (fase 1) com a vacina fabricada pela Merck, que incorporou a Hawaii Biotec. O antígeno desta vacina é VHB-001 D1, baseada na proteína recombinante E de DENV1 produzida em células de drosófila (Murphy & Whitehead, 2011).

1.9.5 Outras vacinas

Além das vacinas citadas acima, uma abordagem que também vem sendo testada para gerar respostas imunes protetoras contra dengue são as vacinas de DNA. A vacina de DNA consiste na administração de plasmídeos contendo um cassete de expressão eucariótico, responsável por codificar a proteína de interesse no hospedeiro, possibilitando a geração de antígenos *in vivo* (Gurunathan *et al.*, 2000a). Como o foco do nosso estudo é a análise da resposta imune induzida por uma vacina de DNA contra dengue, esse tópico será abordado com mais detalhes no item 1.10.6.

1.10 Vacinas de DNA

Os primeiros estudos que levaram ao desenvolvimento de vacinas de DNA tiveram seu início nos anos 90, quando Wolff e colaboradores (1990) inocularam em camundongos, por via intramuscular, plasmídeos de expressão em células eucarióticas contendo genes que codificavam as proteínas cloramfenicol acetil transferase, luciferase e β -galactosidade. Tais estudos demonstraram que o DNA plasmidial era capturado pelas células musculares, que passavam a sintetizar as proteínas recombinantes (Wolff *et al.*, 1990). No entanto, a primeira evidência na literatura do uso imunológico desta abordagem foi em 1992 por Tang e colaboradores (Tang *et al.* 1992), que mostraram que a inoculação do gene que codifica o hormônio do crescimento humano em camundongos foi capaz de induzir anticorpos específicos contra este hormônio. No ano seguinte, Ulmer e colaboradores (1993), inocularam em camundongos um plasmídeo que codificava a nucleoproteína do vírus influenza e observaram que essa vacina era capaz de induzir células TCD8⁺ e anticorpos específicos, sendo essa resposta imunológica forte o bastante para proteger o camundongo do desafio viral.

Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos após a imunização com DNA contendo genes de diversos outros patógenos, incluindo vírus (Davis & McCluskie, 1999), bactérias (Strugnell *et al.*, 1997) e protozoários (Kalinna, 1997). Tal abordagem também foi utilizada para tratamento de alguns tumores (Liu *et al.*, 2004) e doenças autoimunes (Ramshaw *et al.*, 1997).

1.10.1 Os plasmídeos

Basicamente, as vacinas de DNA são compostas de plasmídeos codificando antígenos específicos. Estes vetores geralmente contêm um gene de resistência a antibiótico controlado por um promotor procariótico e uma origem de replicação, permitindo a seleção e replicação dos plasmídeos em bactérias. A unidade de transcrição em eucariotos é composta na maioria das vezes por um promotor viral forte e constitutivo, que confere um alto nível de expressão da proteína recombinante de interesse, um códon de parada da tradução e uma sequência sinal de poliadenilação (Poli A), que leva a uma maior estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (Fig. 1.10) (Feltquate, 1998; Gurunathan *et al.*, 2000b).

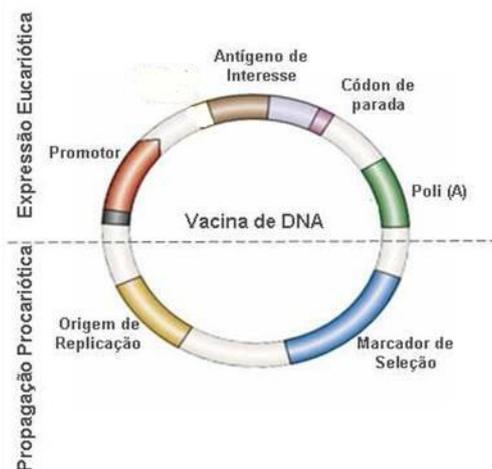


Figura 1.10: Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA. Na parte superior encontra-se a região responsável pela expressão do antígeno em células eucarióticas, contendo promotor, códon de parada de tradução, e a sequência sinal Poli-A. Na parte inferior encontra-se a região que permite sua propagação em bactérias, contendo uma origem de replicação procariótica e um marcador de seleção (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

Diversos vetores utilizados para vacina de DNA contêm a origem de replicação (ColE1) de *Escherichia coli*, capaz de manter mais de 20 plasmídeos por bactéria, o que resulta na sua alta produção em um período relativamente curto de tempo (Ingolotti *et al.*, 2010). Os marcadores de seleção mais utilizados são genes que conferem resistência a antibióticos, sendo a resistência a canamicina a única permitida para uso em humanos (Ingolotti *et al.*, 2010). No cassete de expressão eucariótica, os promotores virais, como o do citomegalovírus (pCMV), do vírus Sarcoma de Rous (pRSV) e do vírus de

símio 40 (pSV40) são frequentemente utilizados para a expressão do antígeno de interesse em uma grande variedade de células de mamíferos (Becker *et al.*, 2008). O pCMV é o mais usado atualmente, por promover um alto nível de expressão constitutiva (Norman *et al.*, 1997, Garmony *et al.*, 2003).

Outra abordagem que tem sido utilizada ultimamente é otimização dos códons para maximizar a expressão do antígeno de interesse na célula hospedeira, o que envolve alteração específica da sequência codificadora com a utilização de códons para tRNAs que são mais abundantes na célula a ser tranfectada, podendo resultar em maiores taxas de tradução da proteína recombinante (Kim & Sin, 2005; Tokuoka *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Além disso, a otimização do mRNA também pode auxiliar a maior expressão da sequência de interesse, diminuindo o número de sequências ricas em CG, que podem inibir a tradução da proteína devido ao aumento da formação de estruturas secundárias (Besse & Ephrussi, 2008).

Além disso, seguindo esse racional, é possível alterar o desenho do gene de interesse retirando regiões prejudiciais à expressão da proteína ou incorporando sequências que sinalizam para diferentes compartimentos celulares, como a membrana plasmática, ou para a secreção para o meio extracelular. Como consequência, essas diferenças afetam a forma de apresentação do antígeno ao sistema imunológico, influenciando na resposta imune gerada (Alves *et al.*, 1999, 2000; Donnelly *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007). Sendo assim, a inclusão de sequências sinais secretoras, bem como a adição da sequência LAMP (do inglês *lysosomal-associated membrane protein*) que direciona o antígeno para compartimentos especializados contendo MHC-II, leva ao aumento significativo dos níveis de anticorpos específicos para a proteína em questão (Leitner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004; Anwar *et al.*, 2005). Por outro lado, o direcionamento da proteína para a via de degradação ubiquitina (Ub)/proteossoma, através da construção de proteínas fusionadas à ubiquitina, pode aumentar a resposta T citotóxica contra o antígeno (Rodriguez *et al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 2005; Dobaño *et al.*, 2007).

1.10.2 Adjuvantes e resposta imune induzida com as vacinas DNA

Outra abordagem interessante é a utilização de sequências imunoestimulatórias, chamadas motivos CpG (não-metilados), que são responsáveis pela ativação do receptor Toll-like 9 (TLR-9) através de dimerização. Tais motivos desempenham um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa, pela estimulação de linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e células “Natural Killer” (Células NK) (Li e Zhu, 2006; Kumagai *et al.*, 2008). A célula pode discriminar entre DNA endógeno e DNA exógeno com base nestes motivos, sendo estas sequências praticamente ausentes em células humanas e apresentando propriedade adjuvante nas vacinas de DNA (Angel *et al.*, 2008).

Além disto, algumas pesquisas vêm demonstrando que a co-injeção de plasmídeos que codificam citocinas e moléculas co-estimulatórias podem modular a resposta imune (Ulmer *et al.*, 2006). Um resultado interessante foi obtido em macacos com a vacina de DNA em desenvolvimento contra HIV-1, em que a co-administração de plasmídeos codificando IL-12 e IL-15 aumentou a imunidade celular e humoral (Chong *et al.*, 2007).

Para melhorar a imunogenicidade da vacina, ao invés de aumentar o número de doses, alguns pesquisadores sugerem o uso de uma vacina mista, na qual a primeira dose da vacina tem uma plataforma de produção e o reforço tem outra diferente, denominado dose-reforço (*prime-boost*) (Wang *et al.*, 2004, Azevedo *et al.* 2013). Esta estratégia aumenta a potência da vacina de DNA, particularmente a produção de anticorpos e a resposta celular (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001, Azevedo *et al.* 2013). A estratégia de dose-reforço tem sido aplicada a um grande número de vacinas, incluindo contra o HIV (Dale *et al.*, 2006; Kent *et al.*, 2007; Patterson e Robert-Guroff, 2008), vírus da gripe aviária (Pan *et al.*, 2009), malária (Moore e Hill, 2004) e dengue (Azevedo *et al.* 2013), demonstrando que esta técnica pode produzir melhores resultados imunológicos.

O mecanismo de indução da imunidade por vacinas de DNA ainda não está completamente esclarecido e alguns estudos sugerem que elas podem mimetizar uma infecção viral natural. Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas de DNA resultam na apresentação antigênica via

moléculas de MHC de classe I e classe II, ativando linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e a produção de anticorpos. As APCs apresentando o antígeno podem migrar para os linfonodos, ativando linfócitos T via MHC e receptores de células T (TCR) e também linfócitos B via receptores de células B (BCRs), induzindo assim a produção de anticorpos (Kutzler e Weiner, 2008). A ativação inicial de células T e B é pequena, mas uma vez que essas células migram de volta para o tecido transfectado, elas podem sofrer re-estimulação. Neste ponto, as células TCD8⁺ podem lisar as células que apresentam peptídeos antigênicos. Além disso, as células TCD4⁺ podem ativar células dendríticas imaturas, repetindo o ciclo de ativação (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001).

Como a vacina de DNA geralmente é administrada via intramuscular, o miócito é a primeira célula que entra em contato com o material genético fornecido. Por não possuir moléculas co-estimulatórias, apesar de conseguir apresentar o antígeno processado, esta célula não é capaz de ativar linfócitos T. Assim, o que se acredita é que essa célula, após codificar o antígeno, libera-o para uma célula apresentadora de antígeno (APC) que o processa e apresenta os peptídeos via MHC de classe I. Este mecanismo é chamado de cross-priming (Fu *et al.*, 1997; Dupuis *et al.*, 2000; Liu, 2011).

1.10.3 Vias de administração

Outro fator que pode alterar o padrão da resposta imune gerada é a variação na via de administração do plasmídeo recombinante, assim como sua forma de apresentação “DNA nu” ou incorporado a veículos abióticos ou vivos. A forma mais utilizada de administração do DNA plasmidial é a via parenteral, que inclui as inoculações intramuscular (i.m.) e intradérmica (i.d.) (Shedlock & Weiner, 2000).

O uso de agulha para injetar uma solução aquosa de DNA plasmidial em tecidos é um caminho relativamente simples e efetivo de inoculação das vacinas de DNA. Diferentes métodos cutâneos para a entrega do plasmídeo vacinal vêm sendo investigados, como, por exemplo, a injeção intradérmica ou subcutânea, cujos alvos são fibroblastos e queratinócitos; o uso tópico, como o *DermaVir*, que transfeta células de Langerhans, por meio de um adesivo cutâneo (Lori *et al.*, 2007); e o *Painting DNA*, que consiste em descascar algumas camadas da pele, a fim de obter uma transfecção mais eficiente

(Watabe *et al.*, 2001). Nas imunizações i.m. aparentemente poucas células dendríticas são transfectadas diretamente, contudo estas são capazes de apresentar o antígeno, devido ao *cross-priming* a partir dos miócitos transfectados (Dupuis *et al.*, 2000; Gurunathan *et al.*, 2000a; Shedlock & Weiner, 2000; Donnelly *et al.*, 2005).

A biobalística ou *gene gun* é outro método para aumentar a entrega epidérmica de DNA, onde as células de Langerhans e queratinócitos são diretamente transfectados pelo bombardeio de partículas de ouro revestidas com os DNAs plasmídiais (Shedlock & Weiner, 2000, Fuller *et al.*, 2006). Diversos trabalhos têm preferido rotas especiais de administração para fins específicos, como: mucosa vaginal (Kanazawa *et al.*, 2008), intranasal (Brave *et al.*, 2008) e mucosa gástrica (Guimaraes *et al.*, 2009).

Adicionalmente, tem sido amplamente estudado o método de eletroporação ou eletropermeabilização para a entrega de vacinas de DNA, tanto por via intramuscular quanto intradérmica. A aplicação de pulsos de alta voltagem com duração de milissegundos em um tecido pode descontinar a membrana celular e gerar poros que podem persistir por horas e permitir a entrada de macromoléculas no citoplasma, tais como drogas, peptídeos e vacinas de DNA (Zaharoff *et al.*, 2002., Villarreal , 2013). A nanotecnologia também vem sendo explorada para facilitar a internalização da vacina de DNA. Esta tecnologia é atualmente aplicada na entrega de drogas, mas já está sendo estudada para a entrega de vacinas de DNA e terapia gênica (Peek *et al.*, 2008, Santos *et.al.* 2012). Para facilitar a entrada do DNA na célula são utilizados lipossomas (Xu *et al.*, 2008, Ribeiro *et. al.* 2013) ou micropartículas poliméricas biodegradáveis (O'Hagan *et al.*, 2006).

1.10.4 Vacinas de DNA licenciadas e ensaios clínicos

Os progressos nesta área resultaram até o momento no desenvolvimento e comercialização de quatro vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário, sendo duas delas contra doenças infecciosas: a vacina contra o vírus do Oeste do Nilo, um outro flavivírus, em cavalos (Center for *Disease Control and Prevention and Fort Dodge Laboratories* - USA) e contra o vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmão (Novartis - Canadá). Além disto, uma vacina contra o melanoma maligno em cães (Merial - USA) e uma para

terapia relacionada à liberação hormonal do fator de crescimento em suínos (VGX Animal Health - Austrália) também foram licenciadas (Kutzler e Weiner, 2008).

Atualmente, vêm sendo realizados diversos ensaios clínicos, profiláticos e terapêuticos, utilizando vacinas de DNA (www.clinicaltrials.gov). Até junho de 2013, foram registrados aproximadamente 774 ensaios clínicos de vacinas de DNA. Alguns destes ensaios estão direcionados à avaliação de vacina contra doenças infecciosas como HIV, hepatite B, malária, febre hemorrágica pelo vírus Ebola, e dois estudos contra a infecção pelo DENV, sendo um completo e outro em andamento (www.clinicaltrials.gov). Devido à quantidade cada vez maior de ensaios clínicos baseados nesta tecnologia, torna-se necessária a avaliação de algumas questões relativas à segurança destas vacinas. As vacinas de DNA que estão sendo testadas atualmente não apresentam níveis relevantes de integração no genoma da célula hospedeira (Temin, 1990; Kurth, 1995; Manam *et al.*, 2000; Ledwith *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2006; Sheets *et al.*, 2006). Com relação ao desenvolvimento da autoimunidade, estudos pré-clínicos em primatas não-humanos e os primeiros estudos em seres humanos não detectaram aumento de anticorpos anti-nucleares ou anti-DNA, não havendo evidência convincente do desenvolvimento de auto-imunidade em resposta à vacina de DNA (Bagarazzi *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 1998; Klinman *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2000).

1.10.5 Vantagens das vacinas de DNA

As vacinas de DNA apresentam inúmeras vantagens sobre as vacinas tradicionais em termos de segurança, facilidade de fabricação, estabilidade e imunogenicidade como podemos observar na tabela 1.3. Entretanto, ainda existe a necessidade de se desenvolver estratégias mais eficientes para melhorar a resposta imune gerada por vacinas de DNA em primatas incluindo o homem. Vacinas de DNA inoculadas por via i.m. ou intradérmica utilizadas em estudos clínicos iniciais não se mostraram tão imunogênicas em humanos quando comparada à resposta que as mesmas geraram em camundongos. Uma das dificuldades estaria relacionada à baixa eficiência de transfecção de células hospedeiras em humanos (Liu & Ulmer, 2005). Dessa forma, várias estratégias têm sido testadas com o intuito de potencializar a resposta induzida

pelas vacinas de DNA. Dentre estas se destacam os diferentes métodos de inoculação ou “entrega” (*delivery*) das vacinas de DNA como, por exemplo, a eletroporação (Widera *et al.*, 2000). Além disso, a combinação de vacinas de DNA com outras vacinas em sistemas de dose e reforço (*prime-boost*) podem gerar respostas imunes mais eficientes (Krieg, 2001; Khanam *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010; Eickhoff *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011).

Tabela 1.3: Vantagens na utilização das vacinas de DNA (adaptado de Kutzler e Weiner, 2008)

Características	Vantagens
Construção	Modificações no plasmídeo vacinal podem ser feitas em curto período de tempo Possibilidade de otimização dos plasmídeos Utilização dos avanços da genômica para a construção da vacina Rápida produção e formulação
Tempo de fabricação	Reproduzível em produção em larga escala
Segurança	Incapacidade de reversão a formas virulentas como as vacinas vivas Diferente de algumas vacinas inativadas, a eficácia não depende de tratamentos tóxicos Nenhum efeito adverso significativo nos ensaios clínicos até o momento
Estabilidade	Maior termo-estabilidade em relação às outras vacinas Maior vida útil
Imunogenicidade	Indução resposta imune celular e humoral assim como as vacinas vivas

1.10.6 Vacina de DNA para dengue.

Vários grupos têm avaliado o uso da vacina de DNA no controle de infecções por flavivírus em geral. Tais estudos demonstraram a indução de resposta imune protetora em camundongos, suínos e primatas não-humanos após a vacinação com plasmídeos codificando proteínas estruturais flavivirais completas, incompletas ou somente domínios protéicos (Phillpotts *et al.*, 1996; Kochel *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998; Kochel *et al.*, 2000; Konishi *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000; Jimenez & Fonseca, 2001; Mota *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2013). Outros estudos também foram realizados utilizando proteínas não-estruturais de flavivírus, como o vírus da encefalite japonesa, encefalite transmitida por carrapato, hepatite C e DENV (Lin *et al.*, 1998; Encke *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003; Timofeev *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2007.).

O Centro de Pesquisa Médica Naval (NMRC) vem desenvolvendo várias vacinas de DNA expressando proteínas prM e E avaliada em duas espécies de primatas não humanos, que se mostraram moderadamente imunogênica e parcialmente protetora ao desafio (Kochel *et.al.*, 2000, Raviprakash *et.al.*, 2000). Apesar desses resultados, essas vacinas foram testadas em ensaios de fase 1, para a avaliação da segurança e imunogenicidade em voluntários americanos adultos, sem contatos prévios com flavivirus (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00290147). Esse estudo foi composto de 22 adultos que receberam preparações com baixa dose (1,0 mg, n = 10) ou alta dose (5,0 mg, n = 12) por via intramuscular sem uso de agulha (Biojector® 2000), em três doses com um de intervalo de 0, 1 e 5 meses. A reatogenicidade foi mínima, sendo a maioria dos sintomas classificados como leves. Cinco dos 12 voluntários (41,6 %) que receberam altas doses da vacina apresentaram anticorpos mensuráveis, com títulos variando de 11 a 135, enquanto que não foram detectados anticorpos anti-dengue no grupo inoculado com baixa dose. Respostas de células T produtoras de IFN- γ foram detectadas em 50 % e 83,3 % dos indivíduos que receberam baixa dose e alta, respectivamente.

Além destes estudos, nosso grupo vem trabalhando com vacinas contra dengue nos últimos anos, construindo diferentes vacinas de DNA e testando-as em modelos murinos. Essas vacinas foram construídas a partir da sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) ou somente seu domínio III (Azevedo, *et.al.*, 2011, 2013), a proteína NS3 inteira ou somente seus domínios funcionais (Costa, *et.al.* 2012), e a proteína NS1 (Costa *et.al.*, 2006a, 2006b, 2007), que é objeto do nosso estudo.

Uma destas construções é a vacina pcTPANS1, que é derivada do plasmídeo comercial pcDNA3. Neste plasmídeo foi inserida a sequência do gene que codifica a proteína NS1 de DENV2, fusionado ao peptídeo sinal do ativador de plasminogênio humano (t-PA), que promove a secreção da proteína para o meio extracelular. Camundongos BALB/c imunizados com duas doses desta vacina apresentaram cerca de 100 % de proteção e somente 10 % dos animais exibiram uma leve paralisia de membro posterior. Além disso, esta vacina induziu níveis elevados de anticorpos anti-NS1, sendo tal resposta de longa duração, uma vez que foram detectados anticorpos nos animais até 56 semanas após a primeira imunização. Os camundongos também revelaram um

booster da resposta de anticorpos após o desafio com DENV2 ou com uma inoculação da vacina um ano depois do início das imunizações (Costa *et.al.*, 2006a, 2006b).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo o mapeamento da resposta imune protetora gerada por esta vacina de DNA, pcTPANS1, uma vez que até o momento pouco se sabe sobre a participação dos diferentes braços da resposta imune que confere proteção contra dengue no hospedeiro. Avaliamos o papel dos anticorpos e subpopulações de linfócitos T na proteção. Vale ressaltar que os dados obtidos podem ser úteis não apenas para a compreensão dos mecanismos de proteção induzidos pela vacina em questão, mas também para um melhor entendimento das vacinas contra dengue de um modo geral.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem por objetivo o mapeamento da resposta imune protetora gerada pela vacina de DNA pcTPANS1.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a proteção mediada pela transferência passiva de anticorpos provenientes do soro de animais imunizados com a vacina pcTPANS1;
- II. Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas nos soro de animais não imunizados ou vacinados com o pcTPANS1;
- III. Avaliar o papel da resposta imune celular induzida com a vacina pcTPANS1 na proteção contra o vírus através de:
 - a. Depleção de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em camundongos imunizados e desafiados com DENV2;
 - b. Avaliar a proteção mediada pela transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺, provenientes do baço de animais vacinados com o pcTPANS1;
 - c. Avaliar a produção de IFN- γ nos esplenócitos de camundongos vacinados e estimulados *in vitro* com um peptídeo específico de NS1;
 - d. Avaliar a indução de lise celular *in vivo* nos camundongos vacinados, mediada por respostas específicas contra NS1.

3 Materiais e Métodos

3.1 Plasmídeo vacinal

No presente estudo foram utilizados os plasmídeos pcTPANS1 e pcTPA previamente construído pela equipe do laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, chefiada pela Dra. Ada M. B. Alves. O plasmídeo pcTPANS1 é derivado do vetor pcDNA3 (Invitrogen), que contém a região promotora do citomegalovírus humano (CMV), um sítio múltiplo de clonagem, a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH), a origem de replicação derivada do vírus SV40 e o gene que confere resistência a neomicina, para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero. Além disso, este plasmídeo também contém a origem de replicação em células procarióticas (ColE1) e o gene que confere resistência a ampicilina, que são utilizados para a seleção de bactérias contendo tal plasmídeo. Nesse vetor foi inserida a sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA); fusionado ao gene *ns1* de DENV2 cepa Nova Guiné. O plasmídeo pcTPA usado como controle também é derivado do vetor pcDNA3, com a inserção somente da sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, para o direcionamento de proteínas recombinantes para a via de secreção. Os plasmídeos pcDNA3, pcTPA e pcTPANS1 estão representados na figura 3.1.

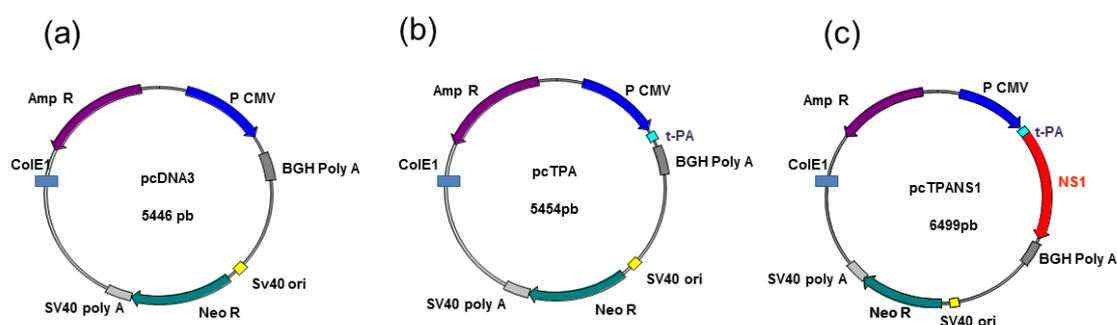


Figura 3.1: Representação esquemática dos plasmídeos: (a) pcDNA3, (b) pcTPA e (c) pcTPANS1. t-PA, sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano; NS1, gene *ns1* de DENV2; P CMV, promotor derivado do citomegalovírus humano; ColE1, origem de replicação em *E. coli*; BGH polyA, sequência de poliadenilação derivada do hormônio de crescimento bovino; SV40 ori, origem de replicação derivada do vírus SV40; NeoR, gene de resistência à neomicina; AmpR, gene de resistência à ampicilina.

Resultados anteriores da equipe demonstraram que cerca de 100 % dos camundongos BALB/c imunizados, por via intramuscular (i.m), com duas doses de 100 µg desta vacina de DNA (pcTPANS1) se mostraram protegidos contra desafios com uma dose letal de DENV2, inoculado por via intracerebral (i.c.) (Costa, *et.al.*2006a,2006b, 2007).

3.2 Purificação dos DNAs plasmidiais:

Para a produção em larga escala dos DNA plasmidiais pcTPANS1 e pcTPA, amostras dos estoques de bactérias transformadas com estes plasmídeos e mantidas em N₂ líquido, foram inoculadas em meio *Luria Broth* (LB) contendo 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 100 µg/mL de ampicilina em 1L. Essas culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação (150 RPM), durante a noite (16–18 h). No dia seguinte 25 mL desta cultura foi adicionada a 1 L de meio TB (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 mL de glicerol e 100 mL de solução 0,17 M de KH₂PO₄ e 0,72 M de K₂HPO₄ em 900 mL de água deionizada) com ampicilina e estas culturas foram mantidas novamente a 37°C sob agitação, durante a noite.

Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina e purificados em colunas de troca iônica, utilizando “Qiagen Plasmid Giga Kit” (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Foram utilizados 3 L de cultura bacteriana para cada coluna Giga. Os plasmídeos foram ressuspensos em água deionizada e armazenado à -20 °C até o momento de uso.

Os DNA foram quantificados em espectrofotômetro Bio Photometer (Eppendorf) no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, a concentração destas amostras de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). Para avaliação da integridade e pureza dos DNAs, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição utilizadas para clonagem dos fragmentos (*Eco* RV e *Xba*I) (Invitrogen), por 1 h a 37° C, em tampão indicado pelo fabricante.

3.3 Vírus

A linhagem DENV2 Nova guiné C (NGC) (Gen Bank M29095) neuroadaptado a camundongos foi gentilmente cedido pelo Dr. Marcos Freire do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), de BioManguinhos / FIOCRUZ. Esta linhagem (primeiro estoque viral) foi usada para obtenção do segundo estoque viral, e também utilizada em alguns ensaios de desafio por via intracerebral (i.c.)

3.4 Estoque viral

Para a produção do estoque viral utilizado nos experimentos de desafio, utilizamos 52 camundongos suíços neonatos (até 48h após o nascimento) inoculados por via i.c. com 20 μ L de $4.32 \log_{10}$ PFU ($5.58 \log_{10}$ PFU/mL) DENV2 NGC neuroadaptado a camundongo. Após 5-7 dias, quando os sintomas de encefalite aparece, foi realizada a eutanásia dos animais por anóxia, utilizando CO₂, para a coleta do tecido cerebral. Os cérebros foram retirados armazenados em tubos de criopreservação e imediatamente congelados em N₂ líquido para posterior processamento. Os cérebros foram macerados em meio 199 com sais de Earle (Sigma) na proporção de um cérebro para 1 mL de meio. Após a ,o foi colocado em outro tubo gelado e adicionado mais 5 mL de meio 199 com sais de Earle e centrifugado nas mesmas condições anteriores para clarificar a suspensão viral. Em seguida, toda a suspensão foi utilizada para propagar o vírus em monocamada de células Vero com 60.000 células/cm², preparadas previamente em garrafas T-175 cm². Foram adicionados 3 mL da suspensão em uma garrafa de células, incubadas a 37° C por 90 minutos para adsorção do vírus, agitando-se a garrafa a cada 15 minutos. Passado o tempo de incubação, 75 mL de meio Earle 199 com 5 % de NaHCO₃ foram adicionados à garrafa que foi novamente incubada a 37° C em estufa até a visualização de efeito citopático (CPE) intenso (4° dia pós-infecção). O sobrenadante de cultura foi coletado e misturado ao estabilizador (sorbitol na concentração de 8 %) e armazenado a -70° C em alíquotas.

3.5 Animais

Todos os animais utilizados nesta tese foram SPF (*specific pathogen free*) provenientes do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Campinas, SP. Para a obtenção do estoque viral, foram utilizados camundongos suíços machos e fêmeas, neonatos (até 48 horas após o nascimento). Para realização dos ensaios de depleção *in vivo*, imunização passiva de anticorpos, transferência adotiva de células T e citotoxicidade *in vivo*, foram utilizados camundongos BALB/c machos, com quatro semanas de idade. Para o estabelecimento da LD₅₀ dos estoques virais, foram utilizados camundongos BALB/c com 8 semanas de idade. Para obtenção de fluidos ascíticos anti-CD4 ou anti-CD8 foram utilizados camundongos machos C3H *NUDE* com cerca de 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal, no biotério do Pavilhão Leônidas Deane do Instituto Oswaldo Cruz.

Para sedação dos animais, foi utilizada uma solução anestésica composta de 150 µL de cloridrato de quetamina 10 % (Konig), 200 µL de cloridrato de xilazina 10 % (Konig) e 650 µL de solução salina estéril (xilazina/ketamia). Para a eutanásia foi utilizada duas vezes a dose anestésica.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo nº P0104-02).

3.6 Cálculo da LD₅₀ de DENV neuroadaptado

A partir da obtenção do estoque viral, a neurovirulência de DENV2 neuroadaptado foi avaliada em camundongos BALB/c machos com 8 semanas de idade. Cinco grupos de animais com n = 10 foram inicialmente anestesiados e inoculados por via i.c. com 30 µL de DENV2 diluído de forma seriada (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) em meio 199 com sais de Earle, a partir do estoque viral produzido anteriormente. Como controle negativo, um grupo de 10 animais foi inoculado somente com o meio de cultura. O inóculo viral foi titulado em células

Vero, imediatamente depois do ensaio de desafio, pela equipe do nosso laboratório, como descrito por Azevedo e colaboradores (2011).

A mortalidade e o grau de morbidade dos animais de cada grupo foram monitorados diariamente ao decorrer de 21 dias. Após esse período, os animais que sobreviveram foram submetidos à eutanásia. A LD₅₀ foi determinada pela correlação entre a diluição viral e a razão entre mortos e sobreviventes, de acordo com o método de Reed & Muench (1938).

3.7 Imunização de camundongos BALB/c

Grupos de camundongos BALB/c foram inoculados com duas doses da vacina de DNA (pcTPANS1) ou do plasmídeo controle (pcTPA) com um intervalo de duas semanas, por via intramuscular (i.m.) nos quadríceps posteriores, com seringa de insulina e agulha ultrafina 30 G (Becton Dickinson). Em cada dose foram inoculados 100 µg de DNA em 100 µl de PBS por animal (sendo 50 µg por pata). No início do experimento e quatro semanas após a primeira dose das vacinas, os animais foram sangrados por via retro orbital para obtenção dos soros pré-ímmunes e ímmunes, respectivamente.

3.8 Desafios com DENV2

Os animais foram desafiados com DENV2 (NGC) neuroadaptado, 15 dias após a última dose da vacina. Para isto, os camundongos ímmunizados e controles foram anestesiados e desafiados por via i.c. com $4.30 \log^{10}$ (primeiro estoque viral) ou $6.70 \log^{10}$ (segundo estoque viral) PFU/mL de DENV2 em 30 µL de meio 199 com sais de Earle, que corresponde a uma dose letal de 4 LD₅₀ ou 40 LD₅₀, respectivamente. Os animais foram monitorados durante 21 dias após o desafio quanto à mortalidade e o grau de morbidade. A morbidade foi quantificada em uma escala subjetiva de 0 a 4: grau 0 = ausência de sinais clínicos; grau 1 = paralisia em uma das patas ou comprometimento da coluna vertebral; grau 2 = paralisia severa em uma das patas e comprometimento da coluna vertebral ou paralisias severas em ambas as patas traseiras; grau 3 = paralisia severa nas duas patas traseiras e coluna vertebral deformada e 4 = morte.

3.9 ELISA

Como antígeno de fase sólida para os ensaios de ELISA foi utilizada a proteína NS1 recombinante expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*). Esta proteína foi purificada e submetida a um tratamento para o seu re-novelamento, levando a formação de dímeros e foi gentilmente cedida pelo Dr. Luis Carlos Ferreira do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (Amorim *et.al.* 2010). As placas de ELISA MaxiSorp (Nunc), foram adsorvidas com a proteína NS1 na concentração de 0,4 µg em 100 µL de PBS por poço e incubadas por 1 hora a 37°C. Ao final desse período, os poços foram bloqueados a 4°C durante a noite, com 200 µL de tampão de bloqueio/poço (leite desnatado 2 % em PBS/Tween 0,05 %). No dia seguinte, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS/Tween 0,05 %. Os soros dos camundongos foram, então, adicionados às placas de ELISA em diluições seriadas, em duplicatas, e incubados por 1 hora a 37°C. Decorrido esse tempo, as placas foram lavadas seis vezes com PBS/Tween 0,05 % e incubadas por 1 hora a 37°C com o segundo anticorpo (anti-IgG total de camundongo) conjugado a peroxidase (*Southern Biotechnology*), na diluição de 1:4000 em PBS. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05 % e deu-se o início do processo de revelação, em que as placas foram incubadas por 20 minutos com uma solução reveladora composta de 5 mg de OPD (O-fenilendiamina dihidrocloro, Sigma) dissolvidos em 12,5 mL de tampão citrato fosfato 33 µM ph 5.0 e 5 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) Merck), em câmara escura, à temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 9 N, e as densidades óticas (D.O.) foram lidas com filtro de 490 nm no leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices).

3.10 Imunização passiva de anticorpos

Grupos de animais imunizados com o plasmídeo vacinal pcTPANS1 e ou com o plasmídeo controle pcTPA foram submetidos à eutanásia para coleta do sangue para obtenção de soros 15 dias após a segunda dose da vacina. Os animais foram anestesiados e sofreram exsanguinação por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos individuais e para obtenção do soro, as amostras

foram mantidas durante 30 minutos em temperatura ambiente e uma hora a 4° C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos e os soros foram recuperados e agrupados e estocados em alíquotas a -70° C até o uso.

Novos grupos de camundongos foram então inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com 300 µl de soro três horas antes do desafio com DENV2. Após o desafio, os animais receberam seis doses de soro em intervalos de três dias, conforme esquematizado na figura 3.2. A mortalidade e o grau de morbidade foram avaliados diariamente durante 21 dias.

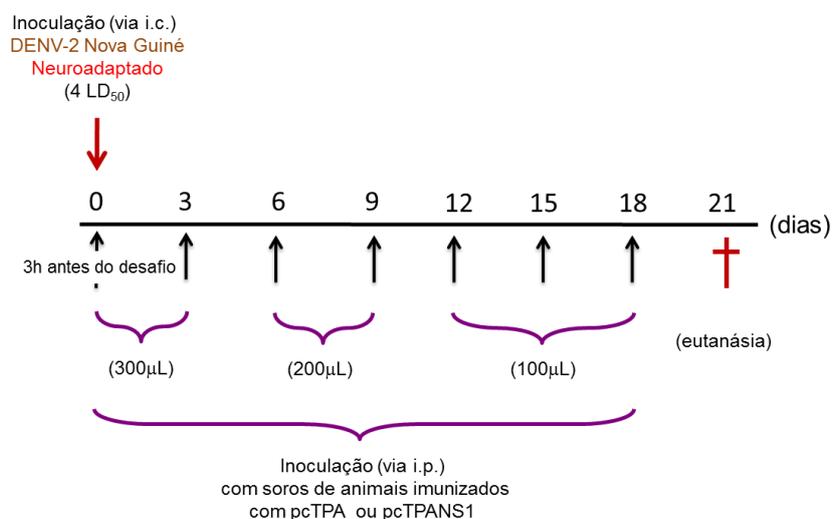


Figura 3.2: Esquema da imunização passiva seguido de desafio com DENV2.

3.11 Produção de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺

3.11.1 Hibridomas

Para realização dos experimentos de depleção *in vivo*, transferência de células T e ensaios de citotoxicidade *in vivo*, foram utilizados anticorpos monoclonais (MoAb) obtidos a partir de fluídos ascíticos de hibridomas GK1.5 (rico em anticorpo anti-CD4) e 53-6.7 (rico em anticorpo anti-CD8). Esses hibridomas foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo dos Santos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz FIOCRUZ– BA. Os respectivos hibridomas foram descongelados e cultivados em frascos com meio de cultura RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 10 µM NaHCO₃ (Sigma) e 1 % de penicilina/estreptomicina (10.000 Unid/mL- Gibco), 2 µM L-

glutamina, 2 μ M de piruvato, 5,5 μ M de 2-mercaptoetanol, pH 7,3 em estufa de CO₂ a 37° C para obtenção de massa celular para posterior inóculo em camundongos.

3.11.2 Produção de ascite em camundongos

Para a produção de fluido ascítico, camundongos machos C3H *nude* com cerca de oito semanas de idade receberam injeção de pristane (Sigma) na cavidade peritoneal, 500 μ l por animal, para promover uma inflamação local. Uma semana depois, os hibridomas GK1.5 (anti-CD4) ou 56.3-7 (anti-CD8) foram inoculados na cavidade peritoneal desses animais na concentração de 10⁷ células/mL. Aguardou-se o período de duas a três semanas após o inóculo, quando o fluido ascítico foi coletado com agulha 40 mm, introduzida direto na cavidade peritoneal, e o líquido foi acondicionado em tubos de 15 mL e mantidos em banho de gelo. Este material foi centrifugado por 15 minutos a 2000 RPM a 4°C, para a retirada de debris celulares. O sobrenadante obtido foi separado em alíquotas e mantido a -70°C até a sua utilização. Esses fluidos ascíticos foram testados por imunohistoquímica para verificação da reatividade dos anticorpos monoclonais em cortes congelados do baço de um camundongo.

3.12 Ensaio de depleção *in vivo* de subpopulações de células T

3.12.1 Padronização do ensaio de depleção *in vivo*:

Após a obtenção dos fluidos ascíticos, foi realizado um experimento piloto para a padronização dos ensaios de depleção *in vivo* das células CD4⁺ e CD8⁺. Grupos de camundongos BALB/c (n=2) receberam 100 μ l, 50 μ l ou 25 μ l dos fluidos ascíticos, administrados por via i.p, em três doses com intervalos de dois dias (fig. 3.3). No 6º e no 15º dia após a primeira dose, os animais foram submetidos à eutanásia, o sangue foi coletado com anticoagulante (heparina 5.000 U. Roche), centrifugado a 1500 RPM em microcentrífuga por 5 minutos para a retirada do plasma, e o sedimento foi incubado com solução de lise (*BD FACS™ Lysing solution* com paraformaldeído, PFA) (1 mL de sangue/10 mL de solução de lise) por 10 minutos para lise das hemácias e fixação das células. Após este tempo as células foram lavadas em PBS, e utilizadas (1x10⁷ células/mL) para a quantificação das subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺

por citometria de fluxo, com o objetivo de avaliar o melhor protocolo de depleção.

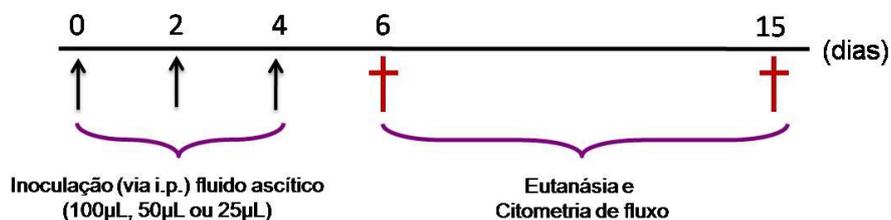


Figura 3.3: Representação esquemática do protocolo de padronização do ensaio de depleção.

3.12.2 Depleção de células T

Camundongos machos BALB/c imunizados com pcTPANS1, pcTPA ou não imunizados foram inoculados com três doses de 25 µl de fluido ascítico rico em anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8, com intervalo de 48 horas entre cada dose. Vinte e quatro horas depois da última dose, esses animais foram desafiados com DENV2 por via i.c. Quinze dias depois do desafio esses animais receberam mais uma dose de fluido ascítico. A mortalidade e morbidade foram avaliadas diariamente durante 21 dias. Os dois protocolos empregados estão esquematizados na figura 3.4.

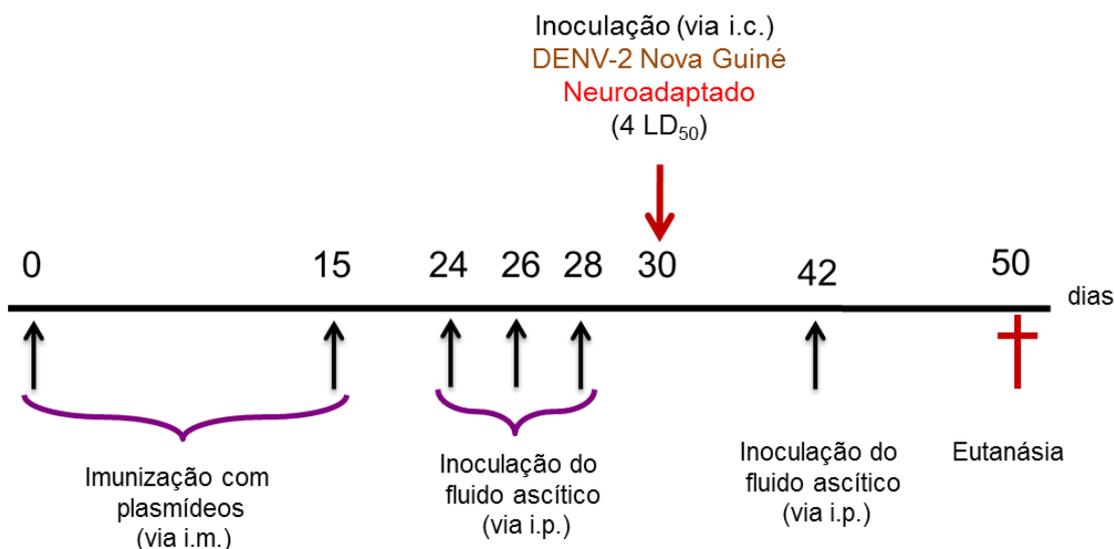


Figura 3.4: Representação esquemática do ensaio de imunização dos animais com a vacina pcTPANS1, seguida de depleção *in vivo* das células CD4⁺ e CD8⁺ e desafio com uma dose letal de DENV2. Durante a imunização (dia 0 e 15^o dia) os animais receberam duas doses de 100 µg da vacina pcTPANS1 (uma dose em cada dia de imunização) por via intramuscular (i.m.). No 24^o, 26^o e 28^o dia, os animais receberam 25 µl de fluido ascítico pela via intraperitoneal (i.p.). O desafio foi realizado com uma dose de DENV2 cepa NGC neuroadaptada a camundongo contendo 4 LD₅₀ em volume de 30 µl por via intracerebral (i.c.) no 30^o dia. Os animais receberam uma quarta dose de fluido ascítico no 42^o dia e finalmente submetidos a eutanásia no 50^o dia.

3.13 Ensaio de transferência adotiva de subpopulações de células TCD4⁺ e TCD8⁺

3.13.1 Isolamento de subpopulações enriquecidas de células TCD4⁺ ou TCD8⁺

Em um teste piloto, foi realizada a eutanásia de três camundongos BALB/c normais para obtenção dos baços que foram dissecados assepticamente e macerados com 5 mL de meio RPMI-1640 (SIGMA). Após a maceração as células foram transferidas para tubos contendo 30 mL de meio RPMI e sedimentadas por 10 minutos para remoção das cápsulas e agregados maiores. O sobrenadante (constituído por esplenócitos) foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 minutos a 2000 RPM, 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em 4 mL de meio de cultura RPMI completo, contendo 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen), 10 µM NaHCO₃ (Sigma) e 1 % de penicilina/streptomicina (Invitrogen), pH 7,3 a 37°C.

Essa suspensão celular foi aplicada em uma coluna de lã de nylon, previamente preparada em uma seringa de 20 mL, e incubada por 1 hora em estufa com 5 % de CO₂, com o objetivo de retirar os linfócitos B. O sistema de retenção da coluna foi feito com uma válvula de equipo. As células foram eluídas com 50 mL de meio RPMI, pH 7,4 a 37°C. O eluído foi centrifugado, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 2x10⁶ mL.

Para a purificação de células T esplênicas foi utilizado o protocolo de seleção negativa com esferas magnéticas do kit Bio Magand Cell Sorting Advancend Magnetics Inc. de acordo com as orientações do fabricante. As células foram incubadas por 30 minutos com anticorpos anti-CD4 ou Anti CD8 (fluido ascítico produzido anteriormente para o ensaio de depleção) e em seguida incubadas por 20 minutos com microesferas sensibilizadas com anticorpos anti-IgG de rato. Ao final desse tempo as células foram submetidas a uma coluna magnética capaz de reter as micro-esferas selecionando negativamente os linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺. A suspensão foi recolhida, acondicionada em tubos de 50 mL e concentrada por centrifugação. Após 10 minutos de centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI para a contagem das células viáveis. A viabilidade celular foi conferida com a utilização do corante vital azul de Trypan (Invitrogen) e a concentração de células ajustadas para 1x10⁷/mL.

As frações obtidas após a seleção negativa foram quantificadas por citometria de fluxo com a utilização de marcadores anti-B220, anti-CD4 e anti-CD8 para determinar o grau de pureza das suspensões celulares.

3.13.2 Transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais vacinados para animais não imunizados e desafiados com uma dose letal de DENV2:

Inicialmente um grupo de 60 camundongos BALB/c foi imunizado com a vacina pcTPANS1 e, 15 dias após a segunda imunização, os animais foram submetidos a eutanásia para obtenção de soro anti-NS1 e baços como descrito nos itens 3.10 e 3.13.1, respectivamente. Posteriormente, populações enriquecidas de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foram inoculadas em novos grupos (n=10) de animais que receberam as sub-populações, por via endovenosa

(retroorbital), 1×10^6 /100 μ L de linfócitos T CD4⁺, ou 5×10^5 /100 μ l de linfócitos T CD8⁺ ou ambas as subpopulações com a inoculação concomitante ou não de soro anti-NS1 (via i.p.), um grupo de 10 animais foram inoculados somente com uma dose de 500 μ L de soro provenientes de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 três horas antes do desafio e utilizado como controle nos testes de transferência adotiva de células T. Todos os grupos estão listados na tabela 3.1. A pureza da população celular resultante foi determinada por citometria de fluxo e foi superior a 90% em todos os experimentos realizados. Após 18 horas, esses mesmos animais foram desafiados com DENV2. Durante o período de 21 dias, os animais foram monitorados quanto à mortalidade e aparecimento de morbidade.

Tabela 3.1: Distribuição dos grupos experimentais para a realização do ensaio de transferência adotiva de célula TCD4⁺ e TCD8⁺ e posterior desafio com DENV2.

Grupos experimentais	Procedimento
pcTPANS1	Vacinados com o pcTPANS1
TCD4 ⁺	Inoculados com células TCD4 ^{+(a)}
TCD8 ⁺	Inoculados com células TCD8 ^{+(a)}
TCD4 ⁺ + Soro	Inoculados com células TCD4 ^{+(a)} e uma dose de soro pcTPANS1
TCD8 ⁺ + Soro	Inoculados com células TCD8 ^{+(b)} e uma dose de soro pcTPANS1
TCD4 ⁺ + TCD8 ⁺	Inoculados com células TCD4 ^{+(a)} e TCD8 ^{+(b)}
Soro	Inoculados com uma dose de soro pcTPANS1
Naive	Somente desafiados com DENV2

^a 1×10^6 células TCD4⁺ provenientes de camundongos vacinados com o pcTPANS1

^b 5×10^5 células TCD8⁺ provenientes de camundongos vacinados com o pcTPANS1

3.14 Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo

Para essa análise foram utilizadas suspensões celulares obtidas a partir do baço e sangue de animais, vacinados ou controles, que foram usados nos diferentes ensaios. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensionado em solução de lise (BD Pharmingen) por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Transcorrido este tempo, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos a 1500 RPM a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado em PBS/BSA 1 %, para posterior contagem. A suspensão celular foi ajustada para a concentração de 1×10^7 /mL.

Em seguida, 100 µL das suspensões celulares foram adicionadas em placa de 96 poços, fundo em V (Nunc), centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 20 µL do *pool* de anticorpos monoclonais (tabela 3.2), por um período de 40 minutos a 4°C ao abrigo de luz. Em seguida, as células foram lavadas com 200 µL de PBS, ressuspensas em 200 µL de PBS e transferidas para os tubos de leitura de FACS.

As amostras foram lidas no citômetro Accuri (*Accuri's C6 FlowCytometer® System*) da rede Dengue e analisadas no programa Cflow® ou no citômetro Beckman Coulter Cyan da Plataforma Multiusuário de Citometria do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/Fiocruz). Neste caso, os dados foram analisados pelo programa Summitv 4.3. Todas as análises foram realizadas utilizando a região que corresponde à população de linfócito, delimitadas com base nos parâmetros morfológicos de tamanho e granulosidade característicos destes tipos celulares.

Tabela 3.2: Painel de anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica de células provenientes de baço ou sangue dos animais.

Anticorpos	Diluição	Isotipo	Fluorocromo	Fabricante
Anti-CD4	1:400	IgG2b	Ficoeritrina (PE)	BD Pharmingen
Anti-CD8	1:50	IgG2ak	Peridina clorofila (PERCEP)	BD Pharmingen
Anti-B220	1:400	IgG2b	Alofocianina (APC)	BD Pharmingen

3.15 Detecção de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT

Os ensaios de ELISPOT (*Enzyme Linked Immunosorbent Spot*) foram realizados para detectar células produtoras de IFN- γ mediante estímulo com peptídeo sintético ²⁶⁵ AGPWHLGKL ²⁷³ contido na proteína NS1 de DENV2, descrito na literatura como específico para células TCD8⁺ (Gao *et al.*, 2008) Duas semanas após a imunização com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA, os animais foram submetidos à eutanásia e seus baços foram removidos, processados como descrito anteriormente no item 3.13.1. Utilizamos também um grupo de três animais *naïves* como controle não imunizado. As células foram homogeneizadas em meio RPMI suplementado com 10% SFB e centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 5 mL da solução de ACK estéril (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ a 10 mM e NA₂EDTA 0,1 mM pH 7.2) para lise de hemácias. Transcorrido 10 minutos foi colocado meio RPMI na suspensão celular contendo ACK e esta mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1500 RPM. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 mL de meio, para a contagem das células viáveis. A viabilidade celular foi conferida com a utilização do corante vital azul de Trypan. As suspensões celulares obtidas a partir de isolados de baço de camundongos vacinados e controles foram ajustadas na concentração de 2x10⁶/mL e analisadas em triplicatas com o *kit* BD ELISPOT IFN- γ Mouse gamma-Set (BD ELISPOT), conforme as recomendações do fabricante. As células foram acondicionadas em placas de 96 poços (Millipore, Bedford), previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- γ de camundongo (10 μ g/mL, 50 μ L/poço) a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as

placas foram lavadas com PBS e bloqueadas com meio RPMI suplementado com 1 % SFB (200 μ L/poço) por 2 h a 37°C. Essas placas receberam 100 μ L/poço de suspensão celular. Além disso, foram adicionados mais 100 μ L/poço de meio RPMI com 10 μ g/mL do peptídeo sintético ou 4 μ g/mL de concanavalina A (controle positivo). Para o controle negativo, as células receberam 100 μ L de meio RPMI. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após este período, as células foram desprezadas e as placas foram lavadas três vezes com PBS e 5 vezes com PBS-Tween 0,05 %, incubadas com anticorpo de detecção anti-IFN- γ biotilado (10 μ g/mL, 100 μ L/poço) por 2 horas, novamente lavadas e incubadas com estreptavidina/peroxidase (diluição 1:1000) por 1 hora. Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05 % e reveladas por 20 minutos com a adição do substrato AEC (BD/Pharmingen) e peróxido de hidrogênio (Sigma). A reação foi interrompida com a lavagem da placa em água corrente. Os *spots* foram contados no leitor automatizado Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH) da Plataforma Multiusuário de ELISPOT do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/Fiocruz).

3.16 Análise quantitativa de citocinas séricas

A análise de citocinas no soro de animais foi realizada pelo método de CBA (*cytometric bead array*) utilizando o *kit* de resposta inflamatória (*mouse inflammation kit* - CBA BD®), que detecta as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, MCP-1 e IL-10. Neste método, os anticorpos específicos para as citocinas de interesse conjugados a microesferas são detectados por citometria de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados utilizando o software FCAParray 3.0 BD®.

3.17 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado três dias após o desafio em animais imunizados e controles de acordo com o esquema da figura 3.5. Cerca de 2×10^8 células de baços de camundongos não imunizados foram incubados com 0,5 μ M ou 5 μ M de *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes (CFSE) em PBS, por 15 minutos a 37°C. Após esta

incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1 % de soro bovino fetal. O tubo contendo a população de células marcadas com 5 μ M de CSFE, foi acrescido 25 μ M do peptídeo ²⁶⁵ AGPWHLGKL ²⁷³ e incubado por 40 minutos a 37°C. Após este período, as células foram lavadas com meio RPMI com 1 % de soro bovino fetal. Quantidades iguais das populações de células marcadas com 0,5 μ M (*Low*) ou 5 μ M (*High*) de CSFE foram misturadas e centrifugadas a 1.500 RPM. O precipitado de células foi ressuspenso em RPMI sem soro bovino fetal em uma concentração de 2 a 4×10^7 células/100 μ L e injetado, pela veia do plexo retroorbital em todos os animais imunizados com plasmídeo vacinal pcTPANS1 ou com o controle pcTPA e desafiados com DENV2. Uma alíquota da mistura celular foi coletada e armazenada para análise de citometria de fluxo. Após 24 horas, todos os camundongos foram submetidos à eutanásia e os baços foram coletados e utilizados para dissociação de células com 5 mL de PBS. O material foi ressuspenso em 10 mL de PBS e sedimentado por 10 minutos para remoção de debris celulares. O sobrenadante foi centrifugado por 10 minutos a 1500 RPM, ressuspenso em 5 mL de solução de lise com PFA e homogeneizado por 10 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas e ressuspensas em 1000 μ L de PBS/BSA (albumina bovina fração V, Sigma) 1 % e mantidas à 4°C por 10 minutos para bloquear sítios de ligações inespecíficas. A detecção das fluorescências emitidas pelas duas populações celulares foram examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo para a determinação das porcentagens de lise das células marcadas com 5 μ M de CSFE em relação à população marcada com 0,5 μ M de CSFE.

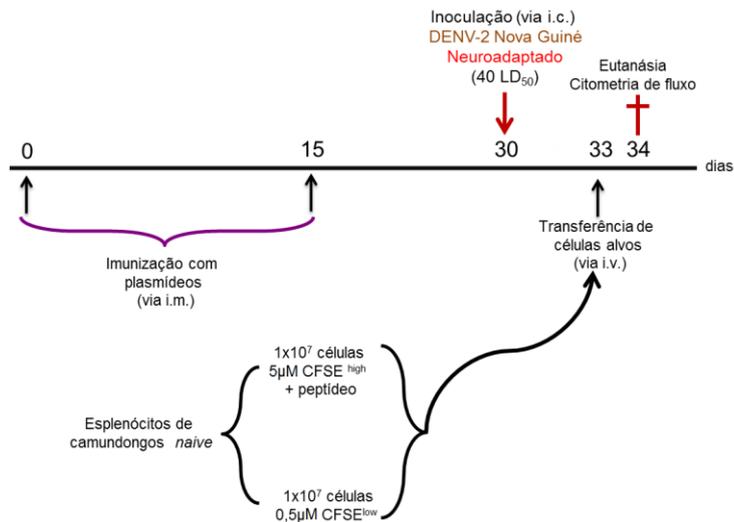


Figura 3.5: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Durante a imunização (dia 0 e 15^o dia) os animais receberam duas doses de 100 µg da vacina pcTPANS1 ou do plasmídeo controle pcTPA (uma dose em cada dia de imunização) por via intramuscular (i.m.). Animais BALB/c foram desafiados ou não no 30^o dia, com uma dose de DENV2 cepa NGC neuroadaptada a camundongo contendo 40 LD₅₀ em volume de 30 µl por via intracerebral (i.c.). Foi feita mistura de esplenócitos de camundongos *naïves* pulsados ou não com peptídeo imunogênico específico para células TCD8⁺ marcados com CFSE em duas diferentes concentrações (5 µM para células pulsadas e 0,5 µM para células não pulsadas). No 33^o dia, animais imunizados ou não com a vacina pcTPANS1 receberam por via intravenosa (i.v.) a mistura de esplenócitos previamente preparada. 20h após a transferência de células, os animais foram sacrificados e os baços foram coletados para análise citométrica.

Em um segundo experimento, os animais vacinados foram submetidos ao tratamento com fluido ascítico para depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺, como descrito no item 3.16, e posteriormente foram inoculados com células CFSE *high* e *low* conforme representado na figura 3.6.

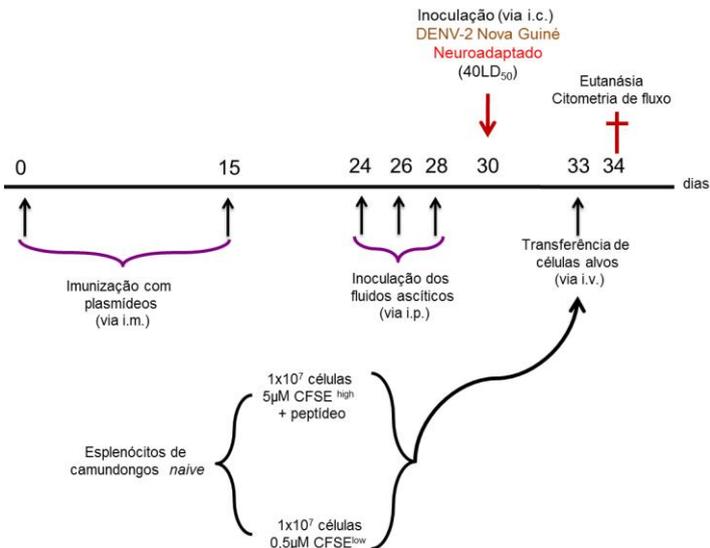


Figura 3.6: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade *in vivo* com depleção de células CD4⁺ e CD8⁺. Durante a imunização (dia 0 e 15^o dia) os animais receberam duas doses de 100 µg da vacina pcTPANS1 (uma dose em cada dia de imunização) por via intramuscular (i.m.). No 24^o, 26^o e 28^o dia, os animais receberam 25 µl de fluido ascítico pela via intraperitoneal (i.p.) para a depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺. Todos os animais foram desafiados no 30^o dia com uma dose de DENV2 cepa NGC neuroadaptada a camundongo contendo 40 LD₅₀ em volume de 30 µl por via intracerebral (i.c.). Uma mistura de esplenócitos de camundongos *naives* pulsados ou não com peptídeo imunogênico específico para células TCD8 foram marcados com CFSE em duas diferentes concentrações (5 µM para células pulsadas e 0,5 µM para células não pulsadas). No 33^o dia, animais imunizados ou não com a vacina pcTPANS1 receberam por via intravenosa (i.v.) a mistura de esplenócitos previamente preparada. 20 h após a transferência de células os animais foram sacrificados e os baços foram coletados para análise citométrica.

3.18 Imunohistoquímica

Para a avaliação de uma possível reatividade dos anticorpos anti-NS1 gerados com a vacina pcTPANS1 com células do tecido hepático, o fígado de um camundongo *naive* foi fixado em formol 10 % e emblocado em parafina. O tecido foi cortado em 4 µm de espessura e os cortes colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropiltriétoxi-silane, Sigma). As lâminas foram acondicionadas na estufa por 30 minutos. Posteriormente, as mesmas foram incubadas em três banhos de xilol seguidos de três banhos de álcool, e lavadas em água corrente e em água destilada. Em seguida, o material foi submetido ao processo de recuperação antigênica com incubação com o tampão citrato pH 6.0 (*Diagnostic Biosystem*) a 100°C em panela de pressão por 5 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram expostas à temperatura ambiente até o resfriamento, e lavadas uma vez com água destilada e três vezes com o tampão tris-HCl (pH 7,4). Em seguida, os cortes foram incubados com H₂O₂ e metanol (diluição 1:1) por 10 minutos com o objetivo de bloquear a peroxidase

endógena. Após a lavagem com o tris-HCl, os cortes foram imersos por 30 minutos em soro fetal bovino 10% para bloquear as ligações inespecíficas e depois lavadas novamente. Posteriormente, os cortes foram bloqueados com avidina-biotina (Biocare Medical) para que não ocorresse marcação inespecífica devido à biotina endógena. As lâminas foram lavadas três vezes com tris-HCl. Posteriormente, o material foi incubado a 4°C durante a noite, com soro provenientes de animais imunizados com pcTPAN1 ou pcTPA diluídos 1:10 em tampão. Todas as incubações descritas acima foram realizadas por uma hora à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas novamente e reveladas com uma solução composta de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Sigma Chem. Co, EUA) na presença de 3 % peróxido de hidrogênio em tampão acetato de sódio, em câmara escura por 10 minutos. Terminada a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente, e as células contracoradas com hematoxilina de Mayer (DAKO). As lâminas foram lavadas novamente em água corrente e montadas em meio aquoso (Aqueous Mounting Medium, Dako® Faramount). O controle negativo seguiu todas essas etapas descritas anteriormente, com exceção da incubação com o soro que foi substituído por PBS.

3.19 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas no soro de animais

O sangue dos animais imunizados foi retirado duas semanas após a segunda imunização. As amostras de soro foram obtidas após centrifugação a 400 RPM por 5 min e armazenadas a -70°C. Os níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram dosados por bioquímica seca com a utilização do aparelho Reflotron (Roche) e tiras específicas para detecção destas enzimas (Roche). A dosagem foi feita conforme prescrito pelo fabricante.

3.20 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* Graph Pad Prism, versão 5.02 (La Jolla, CA, USA), utilizando o teste Mann-Whitney ou Qui quadrado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

4 Resultados

4.1 Vacinas de DNA

A equipe da Dra. Ada M. B. Alves construiu um plasmídeo vacinal, o pcTPANS1, derivado do vetor pcDNA3, onde foram inseridas as seqüências que codificam o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio humano (t-PA) e a proteína NS1 de DENV2 (fig.1).

Dando continuidade a esses estudos, nesta tese investigamos as resposta imunes geradas com a vacina de DNA pcTPANS1 envolvidas com a proteção. Para isto, foi necessária a produção e purificação de massa desta vacina e seu controle (pcTPA).

Para a produção em larga escala dos DNAs plasmidiais pcTPANS1 e pcTPA, amostras dos estoques de bactérias transformadas com estes plasmídeos e mantidas em N₂ líquido, foram descongeladas e inoculadas em meio TB. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina e purificados em colunas de troca iônica, e os mesmos foram quantificados em espectrofotômetro. Para avaliação da integridade e pureza dos DNAs, os plasmídeos foram digeridos para a liberação do inserto com as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* utilizadas para clonagem dos fragmentos. O produto da digestão foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1% como mostrando na figura 4.1 linha 4, onde podemos visualizar a liberação de um fragmento com peso molecular de 1.100 pb, que confere com o tamanho do gene ns1 de DENV2.

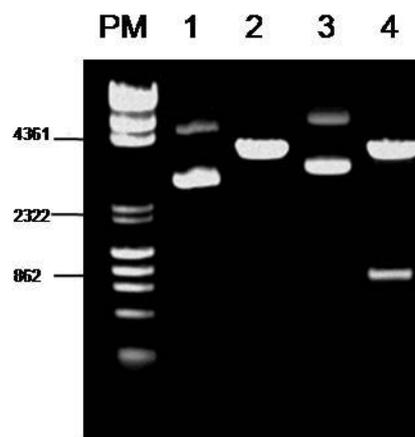


Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose 1 % com os plasmídeos recombinantes. Linhas: 1 pcTPA não digerido; 2 pcTPA digerido com as enzimas de restrições *EcoRV* e *XbaI*; 3 pcTPANS1 não digerido; 4 pcTPANS1 digerido com *EcoRV* e *XbaI*; PM peso molecular λ /*Hind* III + ϕ x/*Hae* III. Figura representativa de 8 preparações de DNA plasmidial.

4.2 LD₅₀ de DENV neuroadaptado

Posteriormente preparamos estoque de DENV2 que foi utilizado nos testes de desafio em camundongos. O primeiro estoque de DENV2 cepa Nova guiné C (NGC) (GenBank M29095) neuroadaptado a camundongos foi gentilmente cedido pelo Dr. Marcos Freire do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), de BioManguinhos FIOCRUZ. Esta linhagem foi utilizada para obtenção do segundo estoque viral, após nova passagem em cérebros de camundongos neonatos que também foi utilizado em alguns ensaios de desafio por via intracerebral (i.c.).

Camundongos BALB/c machos, com oito semanas de idade foram inoculados por via i.c. com o objetivo de determinar a LD₅₀, para posterior utilização desses estoques virais nos ensaios de desafio. O vírus foi inoculado em diferentes diluições (10^0 a 10^{-3}), sendo a mortalidade e a morbidade dos animais acompanhadas durante 21 dias. Os cálculos da LD₅₀ indicaram que o segundo estoque viral mostrou-se muito mais virulento que o primeiro estoque, onde verificamos que 60 % dos camundongos infectados com o primeiro estoque foram a óbito com a dose de 10^0 , enquanto que com a utilização do segundo estoque na mesma diluição, a mortalidade atingiu 100 % no décimo dia após a infecção (figura 4.2a e 4.2c). A LD₅₀ foi determinada pela correlação entre a diluição viral e a razão entre mortos e sobreviventes, de acordo com o método de Reed & Muench (1938), com o primeiro estoque correspondendo aproximadamente a 4,0 LD₅₀ e o segundo estoque viral próximo 40,0 LD₅₀.

Observamos que o soro hiperimune obtido dos animais vacinados com o pcTPANS1 apresentou título de aproximadamente 7.000, enquanto que os camundongos inoculados com o pcTPA, conforme o esperado, não apresentaram anticorpos anti-NS1 (fig. 4.3).

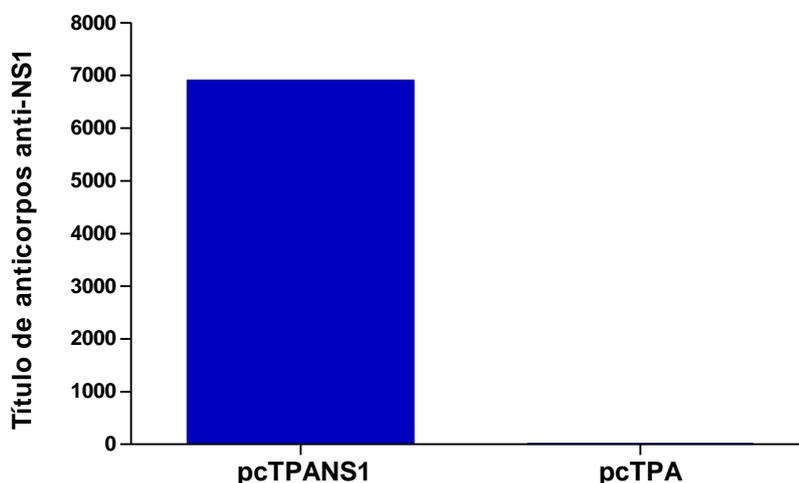


Figura 4.3: Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 no pool de soros de camundongos imunizados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em *E.coli*, testados em duplicata e a barra representa o desvio padrão da média. N=20. Determinação representativa de 5 experimentos.

Após a obtenção do soro hiper imune anti-NS1, novos grupos de camundongos foram inoculados com sete doses destes anticorpos e desafiados com DENV2, segundo esquema a seguir (fig. 4.4). Neste experimento utilizamos o primeiro estoque viral que corresponde a 4.0 LD₅₀. Os animais foram monitorados até 21 dias após o desafio para observação de sinais clínicos da infecção bem como a mortalidade.

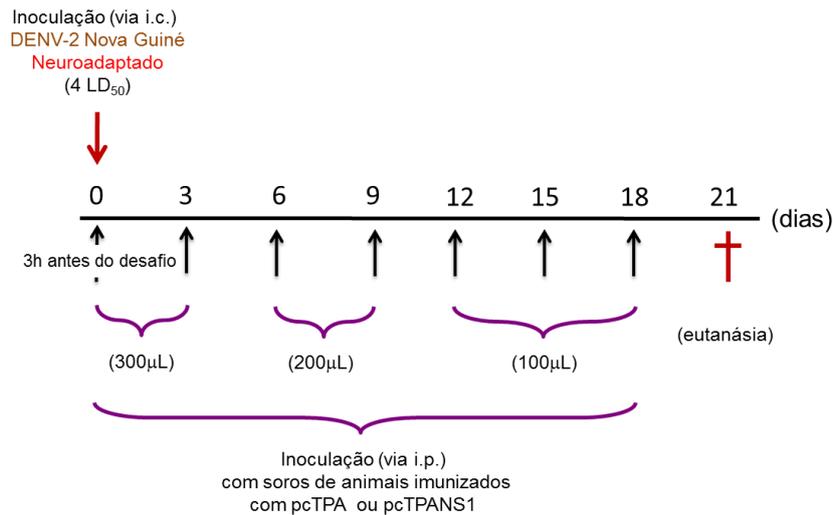


Figura 4.4: Representação esquemática do ensaio de imunização passiva com soros de animais previamente imunizados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados com DENV2. Grupos de camundongos foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com 300 µl de soro três horas antes do desafio com DENV2. Após o desafio, os animais receberam seis doses de soro em intervalos de três dias. A mortalidade e o grau de morbidade foram avaliados diariamente durante 21 dias.

Os resultados obtidos da imunização passiva obtida com o soro gerado com a vacina pcTPANS1 demonstraram uma proteção parcial contra DENV2. Após o desafio com o vírus, observamos que 50 % dos animais que receberam o soro de outros camundongos previamente imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 sobreviveram à infecção (fig. 4.5a). Ao analisar o grau de morbidade, observamos que todos os animais deste grupo que sobreviveu ao desafio não apresentaram nenhum sinal clínico da infecção (fig.4.5b). Por outro lado, no grupo controle, com animais imunizados com o soro obtido com a inoculação com o plasmídeo pcTPA somente 20 % sobreviveram ao desafio (fig.4.5a) e 10 % dos animais não apresentaram sinais clínicos da infecção (fig.4.6b). O grupo de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados, apresentou 90 % de sobrevivência e somente um animal (10 %) apresentou uma leve paralisia em um dos membros que corresponde ao grau 1. Outro dado relevante é que os animais que receberam somente soro pcTPANS1 apresentaram 100 % de sobrevivência e ausência de morbidade, demonstrando que a administração de várias doses de soro não acarretou danos fisiológicos nos animais (figura 4.5.a e b). As diferenças entre os animais inoculados com o soro pcTPANS1 e os controles com soro pcTPA, assim como entre os vacinados com pcTPANS1 e os inoculados com soro pcTPANS1, foram estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).

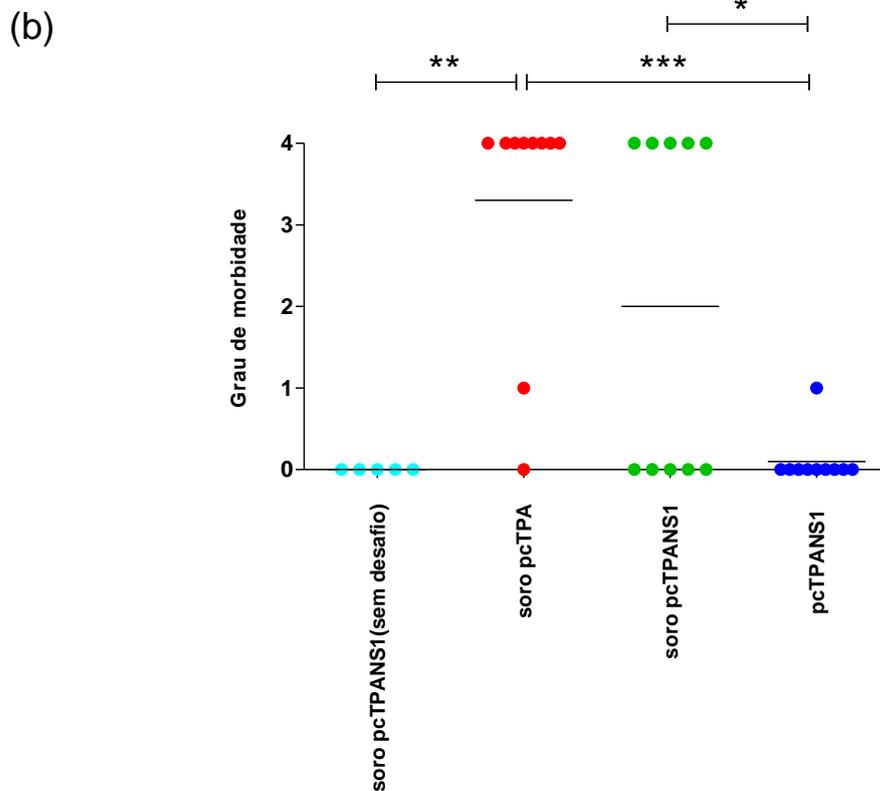
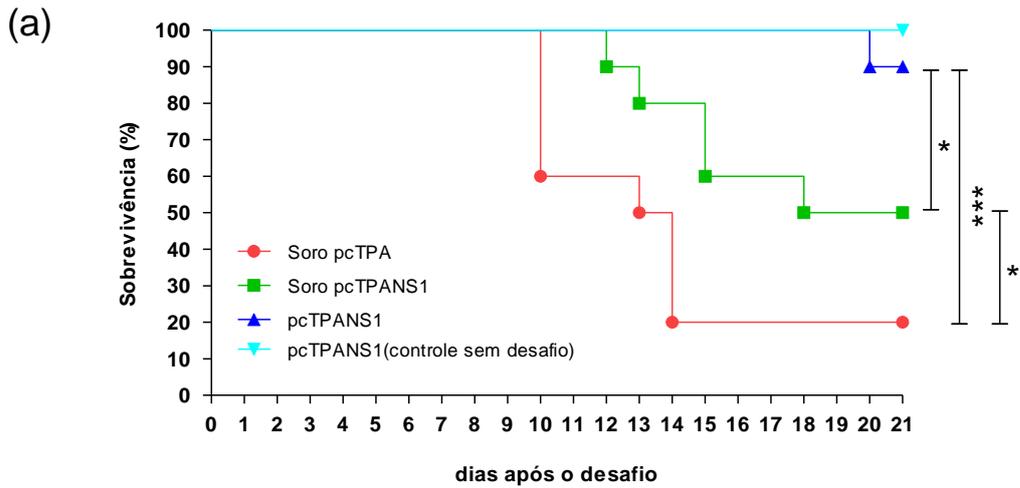


Figura 4.5: Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c inoculados com o pool de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2. O desafio foi realizado com DENV2, 4,0 LD₅₀ (primeiro estoque viral sem diluir). Animais controles com 8 semanas de idade foram inoculados com o soro pcTPANS1 sem o desafio com DENV2. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (p.< 0,01*, p < 0,001; **, p < 0,0001; ***). Os diferentes graus de morbidade foram estimados conforme descrito na figura 9. n = 5 a 10 animais por grupo.

Posteriormente, níveis de anticorpos anti-NS1 foram quantificados nos animais que sobreviveram ao desafio. Também foi incluído neste estudo um grupo de camundongos que recebeu somente o soro pcTPANS1, cujos anticorpos anti-NS1 foram quantificados 21 dias após o início da imunização passiva. Todos os grupos experimentais apresentaram níveis mais baixos de anticorpos circulantes anti-NS1, em comparação com o grupo que foi vacinado com o plasmídeo pcTPANS1, que revelou os títulos variando de 15.000 a 45.000 (fig. 4.6). Este resultado mostra que, conforme o esperado, a ativação de uma resposta imune humoral secundária (*booster*) ocorreu somente nos animais vacinados o pcTPANS1.

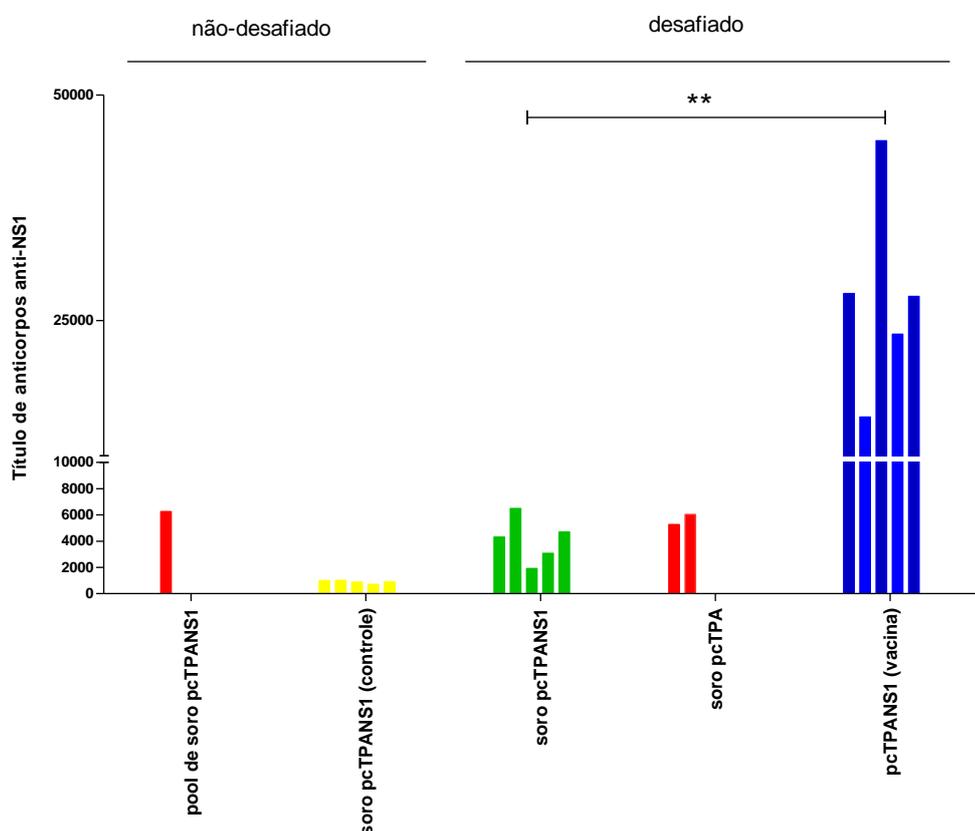


Figura 4.6: Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c imunizados com a vacina pcTPANS1 ou inoculados com o pool de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 e desafiados ou não com DENV2. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em células de *E.coli*. Cada barra representa um animal que sobreviveu ao desafio. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,001$; **).

Após a obtenção do segundo estoque viral e cálculo da LD₅₀, foi realizado um segundo ensaio de imunização passiva com o mesmo desenho experimental do primeiro ensaio (fig.4.4), porém com o desafio com 40LD₅₀ de DENV2.

Neste segundo ensaio de imunização passiva, os resultados obtidos não foram semelhantes ao do primeiro teste. Todos os animais apresentaram altas taxas de mortalidade e fortes sinais clínicos da infecção, com exceção do grupo de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 (fig. 4.7a e b). Como podemos visualizar na figura 4.7a somente 14 % dos animais que receberam soros de camundongos previamente imunizados com a vacina pcTPANS1 sobreviveram ao desafio, contrastando com a taxa de 50 % de sobrevivência atingida no primeiro ensaio. Além disso, 85 % desses animais apresentaram grau máximo de morbidade. Essa diferença tão expressiva só pode ser atribuída à mudança do estoque viral utilizado no desafio, com uma LD₅₀ 10 vezes maior.

De fato, o grau de morbidade e as taxas de mortalidade foram elevados em todos os grupos controles, como por exemplo, nos animais *naïves* e desafiados em que a taxa de mortalidade atingiu 100 % no 15^o dia após o desafio (fig.4.7a). Além disso, os animais imunizados com a vacina pcTPANS1 também apresentaram uma diminuição na taxa de sobrevivência, decaindo de 90 % no primeiro experimento para 80 % no segundo ensaio. Neste grupo cerca de 60 % dos animais não apresentaram sinais clínicos da infecção e os demais camundongos apresentam graus variados de morbidade desde leve paralisia (14 %) à morte (21 %).

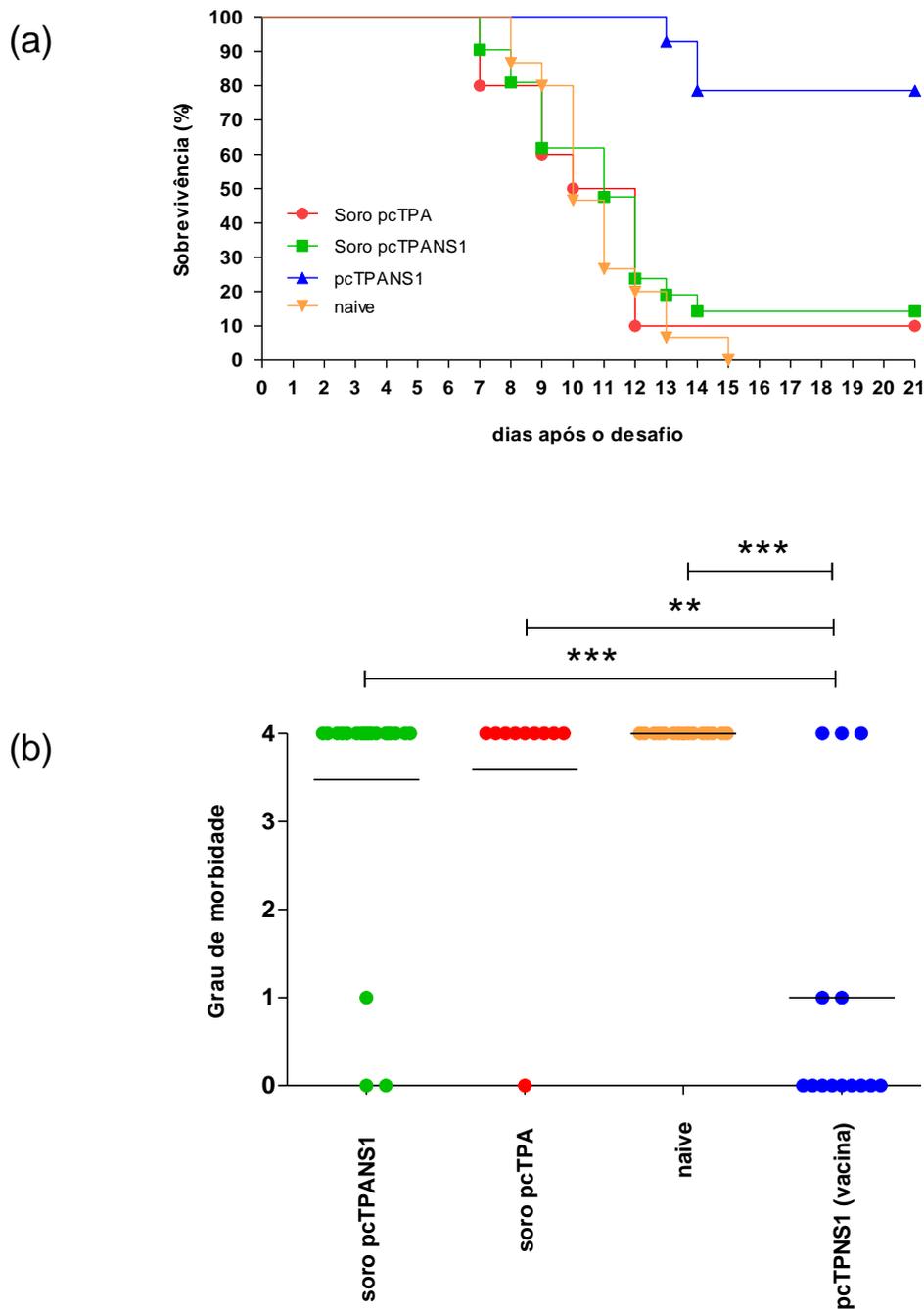


Figura 4.7: Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c inoculados com o *pool* de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2 . O desafio foi realizado com DENV2 utilizando 40 LD₅₀ (segundo estoque viral diluído 10x). Os dados representam compilação de dois experimentos independentes, com grupos de 10 animais em cada ensaio (n = 20). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (p < 0,001; **, p < 0,0001; *). Os diferentes graus de morbidade foram estimados conforme descrito na figura 9.**

Neste segundo ensaio também quantificamos os níveis de anticorpos anti-NS1 dos animais que sobreviveram ao desafio. Como no ensaio anterior, somente os animais imunizados com a vacina pcTPANS1 apresentaram títulos superiores a

25.000 (fig.4.8), caracterizando resposta imune humoral secundária (*booster*). Os animais que foram imunizados passivamente apresentaram baixos títulos de anticorpos.

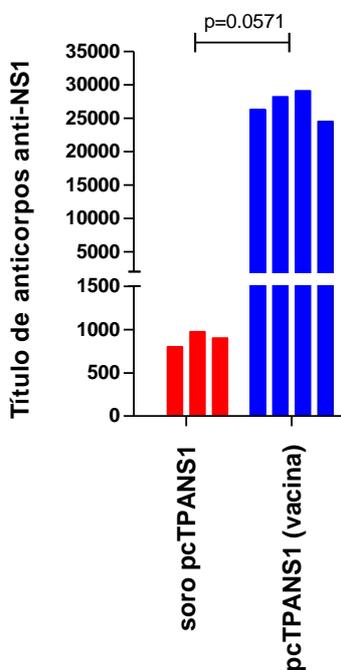


Figura 4.8: Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c inoculados com o *pool* de soros de animais previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou a vacina pcTPANS1 ou imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em células de *E.coli*. Cada barra representa um animal que sobreviveu ao desafio. *p indica a probabilidade utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4.4 Ensaio de depleção *in vivo* de subpopulações de células T

A segunda fase do nosso estudo focou na avaliação da resposta celular. Para investigação do papel de células TCD4⁺ e TCD8⁺ na proteção mediada pela vacina pcTPANS1, foi realizado um ensaio de depleção destas subpopulações de linfócitos nos animais imunizados e desafiados com DENV2.

4.4.1 Padronização do ensaio de depleção *in vivo*

Para realização do ensaio de depleção dos linfócitos T, inicialmente produzimos fluidos ascíticos anti-CD4 e anti-CD8. Para a produção destes fluidos, os hibridomas GK1.5 e 53-6.7, que secretam anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8, respectivamente, foram expandidos em cultura e inoculados na cavidade peritoneal de camundongos NUDE.

Após a obtenção dos fluidos ascíticos, foi realizado um experimento piloto, esquematizado na figura 4.9, para a padronização dos ensaios de depleção *in vivo* das células CD4⁺ ou CD8⁺. No 6^o dia após a primeira dose, os animais foram submetidos a eutanásia, com a coleta do sangue para a quantificação das subpopulações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ por citometria de fluxo. Observamos que o melhor protocolo de depleção foi obtido com a administração de 25 µl de fluido ascítico, que levou a depleção de 99,9 % das células TCD4⁺ e 87,7 % das células TCD8⁺ (tabela 4.1). Outra observação relevante foi o fato de que, quando administramos 100 µl de fluido ascítico anti-CD4, ocorreu também depleção da sub-população de células TCD8⁺ (tabela 4.1). Na figura 4.10 podemos observar três *dot-plot* representativos animais de inoculados com 25 µl de fluido ascítico anti-CD4 ou anti-CD8.

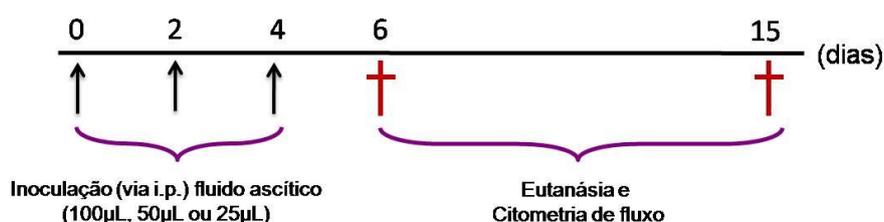


Figura 4.9: Padronização dos ensaios de depleção *in vivo* de células CD4⁺ e CD8⁺: Representação esquemática da padronização do protocolo de depleção *in vivo* das células CD4⁺ e CD8⁺. Grupos de camundongos BALB/c receberam três doses de 100 µl, 50 µl ou 25 µl dos fluidos ascíticos, administrados em intervalos de dois dias, via i.p. No 6^o e 15^o dia após a primeira dose, os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta do sangue e a quantificação das sub-populações de células CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo.

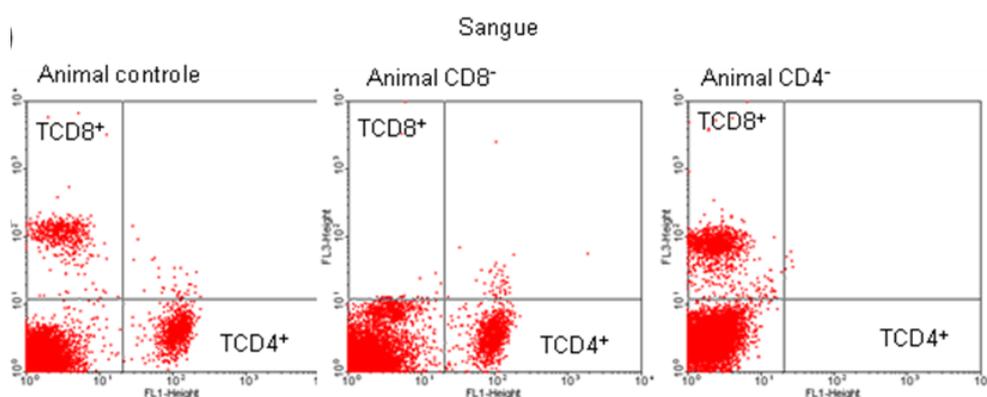


Figura 4.10: Dot plot representando a porcentagem de células TCD4⁺ ou TCD8⁺ observadas no sangue de um animal controle ou camundongos tratados com 25 µl do fluido ascítico com anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8. Após a coleta de sangue e lise de hemácias, as células dos diferentes grupos de animais foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, marcados com FITC e PercP, respectivamente. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo para quantificação da presença das populações de células CD4 e CD8 nos diferentes grupos. Os gráficos de espalhamento (DOT-PLOTS) são

representativos dos resultados obtidos da análise de camundongos tratados com três inóculos de 25µl de fluido ascítico anti-CD4 ou anti-CD8.

Tabela 4.1: Percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos camundongos (n=3) após as inoculações com os fluidos ascíticos, quantificado por citometria de fluxo.

	Animais controles	Animais depletados de TCD4 ⁻			Animais depletados de TCD8 ⁻		
		Dose 100µl	Dose 50µl	Dose 25µl	Dose 100µl	Dose 50µl	Dose 25µl
CD4 ⁺	44 ^a	0,05 ^a (99,8) ^b	0,02 ^a (99,9) ^b	0,02 ^a (99,9) ^b	54 ^a	41,5 ^a	30 ^a
CD8 ⁺	13 ^a	1,8 ^a	21 ^a	25 ^a	0,02 ^a (99,8) ^b	1,7 ^a (98,3) ^b	1,6 ^a (98,4) ^b

^a Percentual de células positivas

^b Os valores entre parênteses correspondem ao percentual de depleção.

4.4.2 Efeito da depleção de células CD4⁺ e CD8⁺ nos animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com uma dose letal de DENV2

Após o estabelecimento do melhor protocolo de depleção de células TCD4⁺ e TCD8⁺, delineamos um protocolo para verificar a importância do papel dessas subpopulações celulares na proteção mediada pela vacina pcTPANS1. Posto isto, animais imunizados com a vacina de DNA pcTPANS1, foram submetidos ao tratamento para depleção dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e desafiados com DENV2, segundo o esquema da figura 4.11. Os camundongos foram monitorados quanto à mortalidade e graus de morbidade durante 21 dias após o desafio. Para garantir a depleção das células TCD4⁺ e TCD8⁺ até o final do experimento, os animais receberam mais uma dose de fluido ascítico, no 42^o dia após o início do experimento (fig. 4.11).

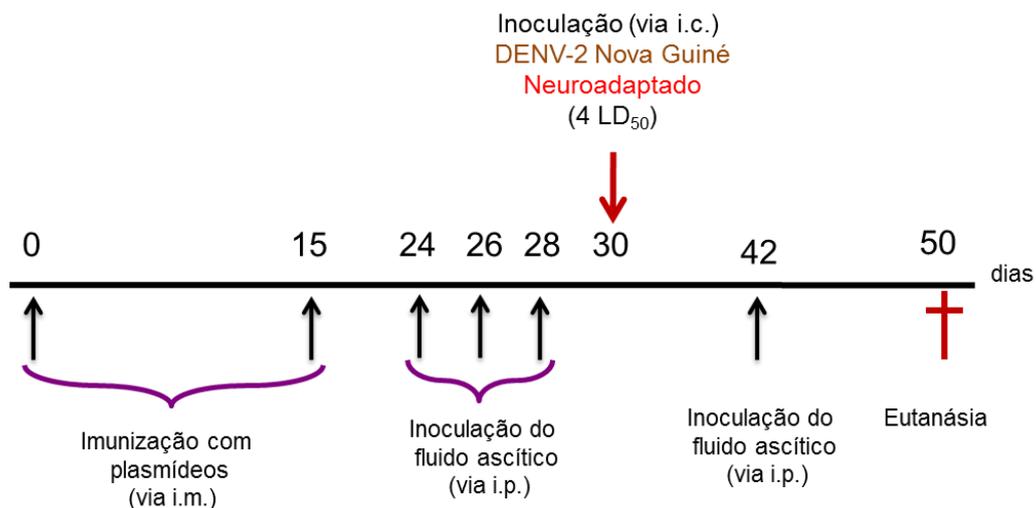


Figura 4.11: Representação esquemática do protocolo de imunização dos animais e depleção das células T CD4⁺ e T CD8⁺, seguido do desafio com uma dose letal de DENV2 (4,0 LD₅₀).

Os resultados mostraram que 60 % dos animais vacinados e depletados de células TCD8⁺ sobreviveram ao desafio (fig. 4.12a), com graus variados de morbidade (4.12b), em que 40 % dos animais não apresentaram sinais clínicos da infecção e 20 % apresentaram uma leve paralisia de um dos membros posteriores. Tais diferenças se mostraram estatisticamente significativas quando comparamos com o observado nos grupos controles, isto é, com animais não vacinados, depletados de CD8⁺ e desafiados, ou somente infectados com o vírus. Por outro lado, todos os animais vacinados e depletados de célula CD4⁺ foram a óbito até o 19^o dia após o desafio (fig. 4.12a e b). Nos grupos controles, todos os animais não vacinados e depletados de células CD4⁺ morreram após a infecção com DENV2 e somente um camundongo não imunizado e depletado de células CD8⁺ sobreviveu a este desafio (fig. 4.12a) de modo semelhante ao grupo de camundongos que receberam somente o vírus (fig.4.12a e b).

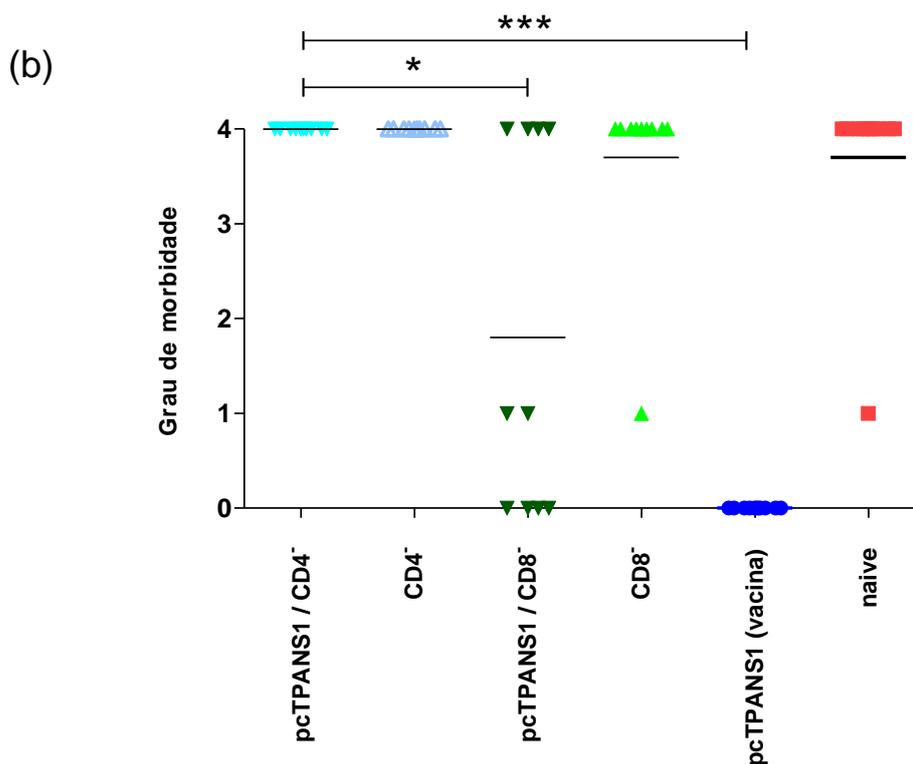
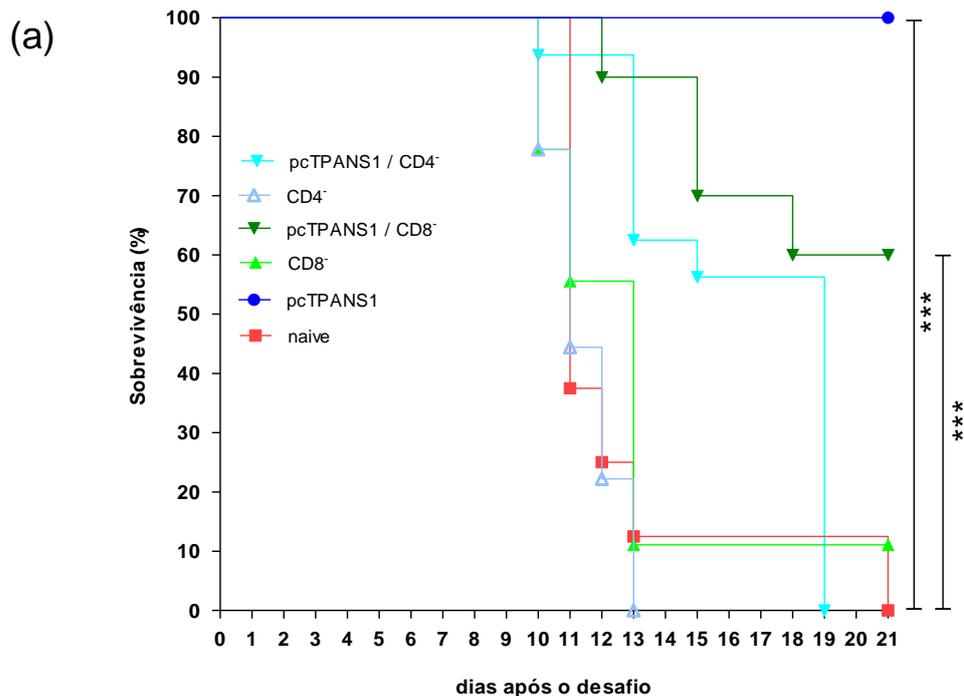


Figura 4.12: Percentual de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos camundongos BALB/c imunizados com a vacina pcTPANS1, depletados de células CD4⁺ ou CD8⁺ e desafiados com uma dose letal de DENV2 (4,0 LD₅₀). O desafio foi realizado com DENV2, 4,0 LD₅₀ (primeiro estoque viral sem diluir). Animais controles com 8 semanas de idade foram inoculados com o soro pcTPANS1 sem o desafio com DENV2. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,01^*$, $p < 0,0001; ***$). Os diferentes graus de morbidade foram estimados conforme descrito na figura 9. $n = 10$ animais por grupo.

Com esse resultado observamos um papel importante das células CD4⁺ no mecanismo de proteção mediado por essa vacina. Entretanto, não podemos descartar a importância dos anticorpos, visto que nesse ensaio, a resposta humoral foi mantida e quando observamos os níveis de anticorpos anti-NS1 após o desafio dos animais vacinados e depletados de CD8⁺ detectamos um aumento no título destas imunoglobulinas (fig.4.13), demonstrando que mesmo após a depleção, a resposta humoral secundária (*booster*) foi preservada.

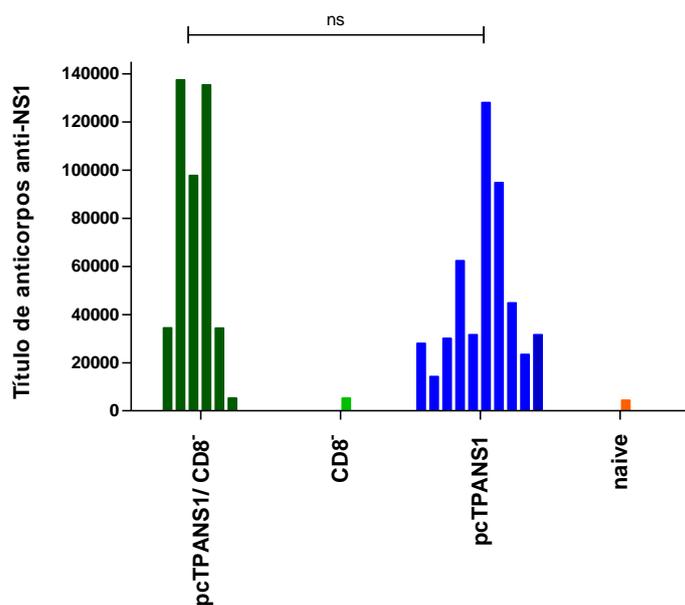


Figura 4.13: Título de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos BALB/c que sobreviveram ao desafio após as depleções. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em células de *E.coli*. *ns = diferença não-significativa entre os grupos utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4.5 Ensaio de transferência adotiva de subpopulações de células TCD4⁺ e TCD8⁺

Com a finalidade de melhor definir o papel das células T que conferem proteção nos camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1, foi realizado um ensaio de transferência adotiva de sub populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ provenientes de camundongos previamente vacinados. Para isto, inicialmente realizamos um experimento piloto para a padronização da obtenção destas células.

4.5.1 Padronização do protocolo para a obtenção de subpopulações enriquecidas de células TCD4⁺ ou TCD8⁺

Os baços de três camundongos não imunizados foram utilizados para a obtenção de uma suspensão de esplenócitos que foi aplicada em coluna de lã de *nylon*, para excluir células B. O eluído desta coluna foi incubado com anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8, seguido da adição de anticorpos anti-Ig conjugados a esferas magnéticas. Estas esferas foram separadas por campo eletromagnético para a seleção negativa dos linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺. As frações obtidas após a seleção negativa foram quantificadas por citometria de fluxo com a utilização de marcadores anti-B220, anti-CD4 e anti-CD8 para determinar o grau de pureza destas frações (tabela 4.2).

Tabela 4.2: Percentual de células TCD4⁺, TCD8⁺ e B nas diferentes subpopulações após os ensaios para enriquecimento de linfócitos T e quantificação por citometria de fluxo.

	Esplenócitos Totais	População enriquecida de CD4 ⁺	População enriquecida de CD8 ⁺
CD4+	22,3	58,5	0,06 (99,7) ^a
CD8+	19,3	2,04 (89,4) ^a	31,5
B	26,2	4,1(84,3) ^a	4,1 (84,3) ^a

^a Percentual de células positivas

^b Os valores entre parênteses correspondem ao percentual de depleção.

4.5.2 Efeito da transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais vacinados para animais não imunizados e desafiados com uma dose letal de DENV2:

Para a realização do ensaio de transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺, inicialmente um grupo camundongos BALB/c foi imunizado com a vacina pcTPANS1 e 15 dias após a segunda imunização, os animais foram submetidos a eutanásia para obtenção dos baços e soro hiper imune anti-NS1. Em seguida, os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foram isolados, inoculados em outros

grupos de camundongos *naïves*, com a inoculação concomitante ou não de soro anti-NS1, de acordo com a tabela 4.3. Durante o período de 21 dias, os animais foram monitorados quanto à mortalidade e morbidade.

Tabela 4.3: Distribuição dos grupos experimentais para a realização do ensaio de transferência adotiva de célula TCD4⁺ e TCD8⁺ e posterior desafio com DENV2.

Grupos experimentais	Procedimento
pcTPANS1	Vacinados com o pcTPANS1
TCD4 ⁺	Inoculados com células TCD4 ⁺ ^(a)
TCD8 ⁺	Inoculados com células TCD8 ⁺ ^(a)
TCD4 ⁺ + Soro	Inoculados com células TCD4 ⁺ ^(a) e uma dose de soro pcTPANS1
TCD8 ⁺ + Soro	Inoculados com células TCD8 ⁺ ^(b) e uma dose de soro pcTPANS1
TCD4 ⁺ + TCD8 ⁺	Inoculados com células TCD4 ⁺ ^(a) e TCD8 ⁺ ^(b)
Soro	Inoculados com uma dose de soro pcTPANS1
Naive	Somente desafiados com DENV2

^a 1x10⁶ células TCD4⁺ provenientes de camundongos vacinados com o pcTPANS1

^b 5x10⁵ células TCD8⁺ provenientes de camundongos vacinados com o pcTPANS1

Os resultados mostraram que 55 % dos animais que receberam concomitantemente soro e linfócitos TCD4⁺, provenientes de animais imunizados com a vacina pcTPANS1, sobreviveram ao desafio com DENV2 (fig. 4.14a). O mesmo ocorreu no que se refere à morbidade desses animais, em que 40 % dos animais não apresentaram sinais clínicos da infecção e 15 % apresentaram graus de morbidade que variavam entre 2 e 3 (fig. 4.14.b). Em contrapartida, foram observadas altas taxas de mortalidade e graus elevados de morbidade nos demais grupos experimentais, nos quais as taxas de sobrevivência não ultrapassaram 20 % (fig. 4.14a), com exceção dos animais controles vacinados com a vacina pcTPANS1, que apresentaram uma taxa de sobrevivência de 75 % e 58 % dos animais que não apresentaram sinais clínicos da infecção (fig. 4.14a e b). Tais diferenças foram estatisticamente significativas quando comparamos com o observado nos grupos de animais

não imunizados (DENV2), ou com os que receberam somente células (TCD4⁺ ou TCD8⁺). Também observamos uma diferença significativa quando comparamos os animais que receberam TCD4⁺ e soro com os inoculados com TCD8⁺ e soro, onde o percentual de sobrevivência foi de 55 % e 11 % respectivamente. Este resultado mais uma vez demonstrou o papel das células TCD4⁺ na proteção, já que a inoculação de soro mais TCD8⁺ ou somente a administração do soro, não foram capazes de promover uma proteção nos animais, com redução da mortalidade e morbidade.

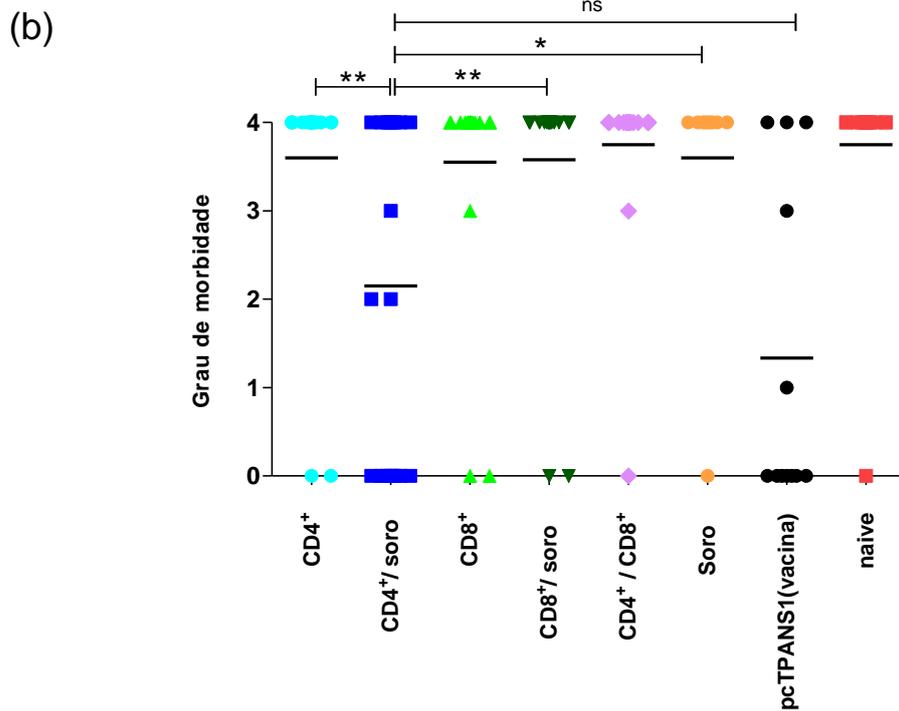
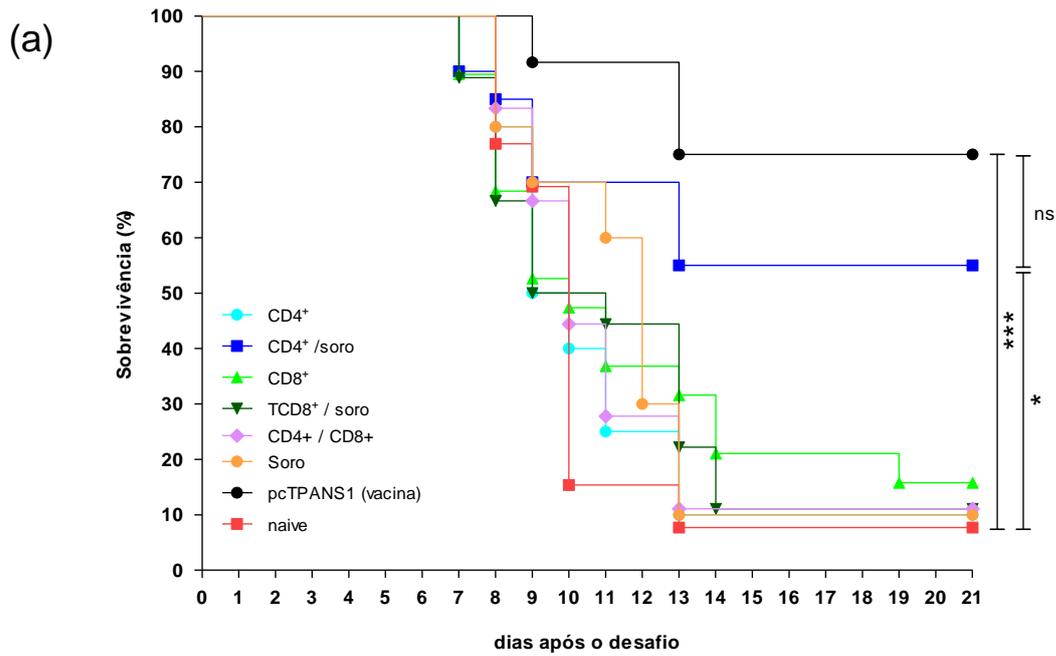


Figura 4.14: Transferência adotiva de células TCD4⁺ e TCD8⁺: (a) Percentual de sobrevivência e (b) grau de morbidade nos camundongos BALB/c que receberam células TCD4⁺ ou TCD8⁺ com administração concomitante de soro ou não, provenientes de outros animais vacinados com o pcTPANS1, e desafiados com uma dose letal de DENV2 (40 LD₅₀). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,01^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$ e ns = não significativo). Os diferentes graus de morbidade foram estimados conforme descrito na figura 9. Os dados representam compilação de dois experimentos independentes, com grupos de 10 animais em cada ensaio ($n = 20$).

No entanto, observamos que o soro proveniente de animais previamente imunizados com a vacina pcTPANS1 exerce um papel na proteção. Diante destes resultados, consideramos que um fator importante a ser analisado seria o perfil de citocinas séricas induzida pela vacina pcTPANS1, isto porque com a administração do soro pcTPANS1, além de anticorpos anti-NS1 também poderíamos estar transferindo alguns mediadores da resposta imune adaptativa tais como citocinas, que são fatores importantes tanto na proteção como na patogênese da infecção, e poderiam estar influenciando nos resultados obtidos. Com a finalidade de avaliar se no soro dos camundongos vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 existiriam níveis mais elevados de algumas citocinas em relação aos animais não imunizados, foram quantificadas pelo método de detecção por microesferas e fluoróforos associado a citometria de fluxo as seguintes citocinas: IFN- γ , MCP-1, TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-10. Como podemos verificar na figura 4.15 não detectamos nenhum aumento significativo das citocinas estudadas. Ao contrário, detectamos uma diminuição significativa dos níveis da citocina IL-6 nos animais imunizados com a vacina pcTPANS1, quando comparados com os soros de animais *naïve*. Portanto, nossos resultados demonstram que após a imunização com a vacina pcTPANS1, não causou uma exacerbação dos níveis de citocinas séricas nos camundongos vacinados, e que a vacina promove uma resposta equilibrada na produção das citocinas. Além disso, estes resultados sugerem que a proteção conferida após inoculação concomitante de células TCD4⁺ e soro, se deve a presença de anticorpos anti-NS1 e não de citocinas presente no soro.

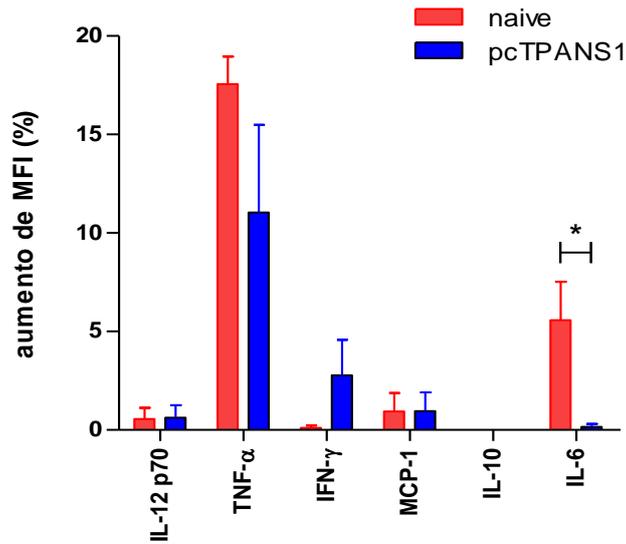


Figura 4.15: Níveis séricos de citocinas dos animais vacinados ou não com pcTPANS1. Citocinas relacionadas com a resposta inflamatória (IL-12 p70, MCP-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) foram determinadas no soro de animais *naive* ou imunizados com pcTPANS1 (n=5). A análise foi efetuada através de citometria de fluxo utilizando sistema de microesferas e fluoróforos. Os valores foram expressos pelo percentual de aumento da média de intensidade de fluorescência em relação ao branco (microesferas sem citocinas). As barras representam o erro padrão e asterisco representa diferença estatisticamente significativa usando o teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

Ao analisar os resultados obtidos com a sorologia para a detecção de anticorpos anti-NS1 dos animais que sobreviveram ao desafio, observamos que o grupo de camundongos inoculados com células TCD4⁺ e soro, manteve os títulos de anticorpos circulantes anti-NS1 inferiores a 5.000, títulos esse observados inicialmente no *pool* soros pcTPANS1 administrados nos animais (fig. 4.16). Este resultado mostra que, apesar da presença de células B residuais (cerca de 4%) na transferência dos linfócitos T, elas não promoveram um *booster* na resposta humoral deste grupo, como ocorre com os animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2 (fig. 4.18). Portanto, esses dados mais uma vez reforçam o papel das células TCD4⁺ geradas com a vacina pcTPANS1 no mecanismo protetor contra DENV.

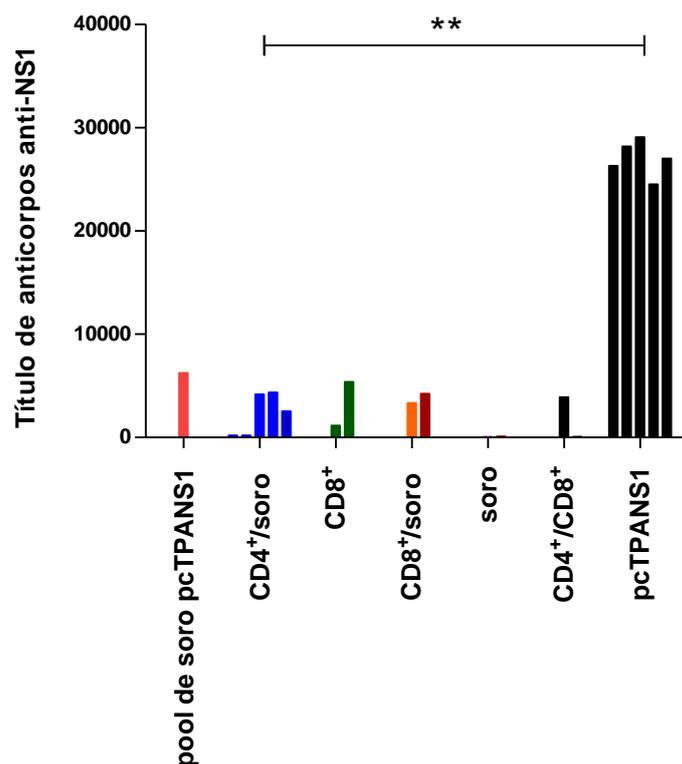


Figura 4.16: Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 nos camundongos que sobreviveram ao desafio com DENV2. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em células de *E.coli*. Cada barra representa um animal que sobreviveu ao desafio. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,001$; **). A barra vermelha (*pool* de soro pcTPANS1) corresponde ao título de anticorpos presente no soro utilizado nas transferências: CD4⁺/soro, CD8⁺/soro e soro.

4.6 Produção de interferon gama nos animais imunizados com a vacina pcTPANS1

A secreção de IFN- γ é importante durante o curso de infecções virais para mediar a resposta imune. Com o objetivo de avaliar a resposta imune celular especificamente quanto à presença de células secretoras de interferon gama (IFN- γ), grupos de camundongos foram inoculados com pcTPANS1 ou com o plasmídeo controle pCTPA. Os esplenócitos foram coletados 15 dias após a última imunização e foram incubados com o peptídeo sintético ²⁶⁵ AGPWHLGKL ²⁷³ contido na proteína NS1 de DENV2, descrito na literatura como específico para células TCD8⁺. Esta ativação foi avaliada quanto à produção de IFN- γ por células formadoras de spots em ensaios de ELISPOT. As células obtidas do baço de animais vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 foram reativas ao peptídeo ²⁶⁵ AGPWHLGKL ²⁷³ e secretaram IFN- γ , (SFC:

68,3 ± 14,18, os valores correspondem a média e o desvio padrão, respectivamente) (Fig. 4.17.a). Como esperado, as células obtidas de animais inoculados com o plasmídeo controle pcTPA não reagiram a este peptídeo (SFC: 1,06 ± 1,14) (Fig. 4.17a). Por outro lado, os esplenócitos de todos os animais responderam inespecificamente com produção de IFN- γ na presença da ConA, sem diferenças significativas entre os grupos, demonstrando a viabilidade das células durante a realização do experimento (Fig. 4.17b).

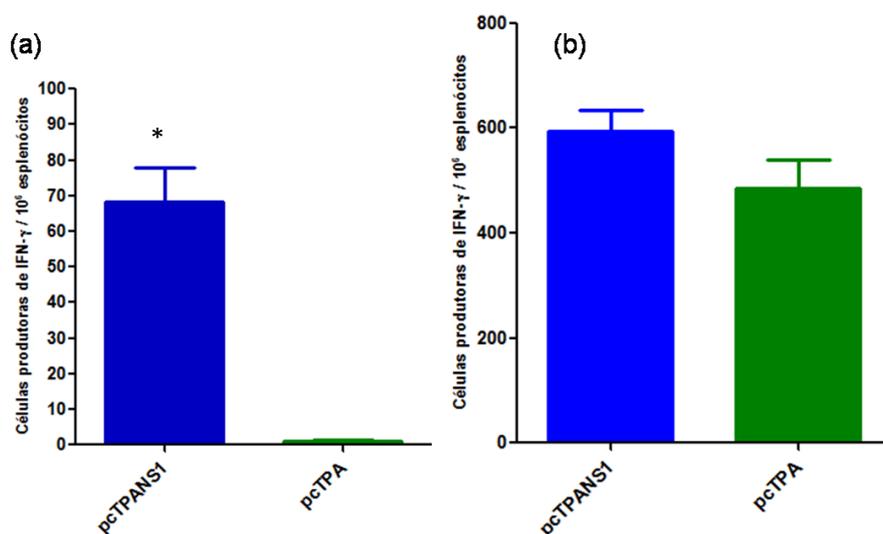


Figura 4.17: Produção de IFN- γ induzida pela vacina pcTPANS1 determinada por ensaio de ELISPOT. Os baços de animais BALB/c inoculados com pcTPANS1 ou pcTPA (n=5 animais) foram coletados duas semanas depois da segunda dose de DNA e processados para o ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com: (a) o peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, contido na proteína NS1 de DENV2 e previamente descrito como imunogênico para células TCD8⁺, ou (b) concanavalina A (ConA), como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . Asterisco representa diferença estatisticamente significativa usando o teste de Mann-Whitney (*p<0,0001).

4.7 Ensaio de Citotoxicidade *in vivo*

Para avaliar a capacidade funcional efetora das células provenientes de animais imunizados com a vacina pcTPANS1, realizamos um ensaio de citotoxicidade *in vivo*, que está esquematizado na figura 4.18a. Grupos de animais BALB/c inoculados com o pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não com DENV2 (40 LD₅₀), receberam uma mistura de esplenócitos provenientes de outros camundongos *naive* incubados com 0,5 μ M de CFSE (low) e com 5 μ M de CFSE (high) pulsados *in vitro* com peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³. Vinte horas após a transferência das células, os animais

foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos foram coletados e avaliados por citometria de fluxo. Na figura 4.18b temos um *Dot plot* representativo da mistura de esplenócitos que foi inoculada nos camundongos imunizados com os diferentes plasmídeos, e na figura 4.18c o histograma evidenciando as populações CFSE^{high} (M1) e CFSE^{low} (M2), contidas em R1, no qual podemos observar a distribuição igualitária das duas populações M1 (49,3 %) e M2 (50,2 %) contida nesta mistura. Conforme o esperado, observamos um baixo índice de lise das células alvo pulsadas com o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ que foram administradas em animais imunizados com pcTPA seguido ou não de desafio com DENV2, variando de 7,5 %, nos camundongos inoculados com pcTPA e 5,2 % para aqueles desafiados com DENV2 (fig. 4.18d). Por outro lado, camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 promoveram a lise de 15,1 % das células alvo (fig.4.18d). Além disso, quando células alvos foram administradas 72 horas após o desafio com DENV2, nos camundongos previamente imunizados com a vacina pcTPANS1, houve um aumento significativo do percentual de lise (79,9 %) (fig.4.18d). A figura 4.18e apresenta um *dot plot* representativo das células CFSE^{high} e CFSE^{low} recuperadas dos diferentes grupos de animais. Esses resultados demonstram que a vacina pcTPANS1 é capaz de induzir a produção de células citotóxicas e a sua atividade de lise é aumentada 5,3 vezes, após ao desafio com DENV2.

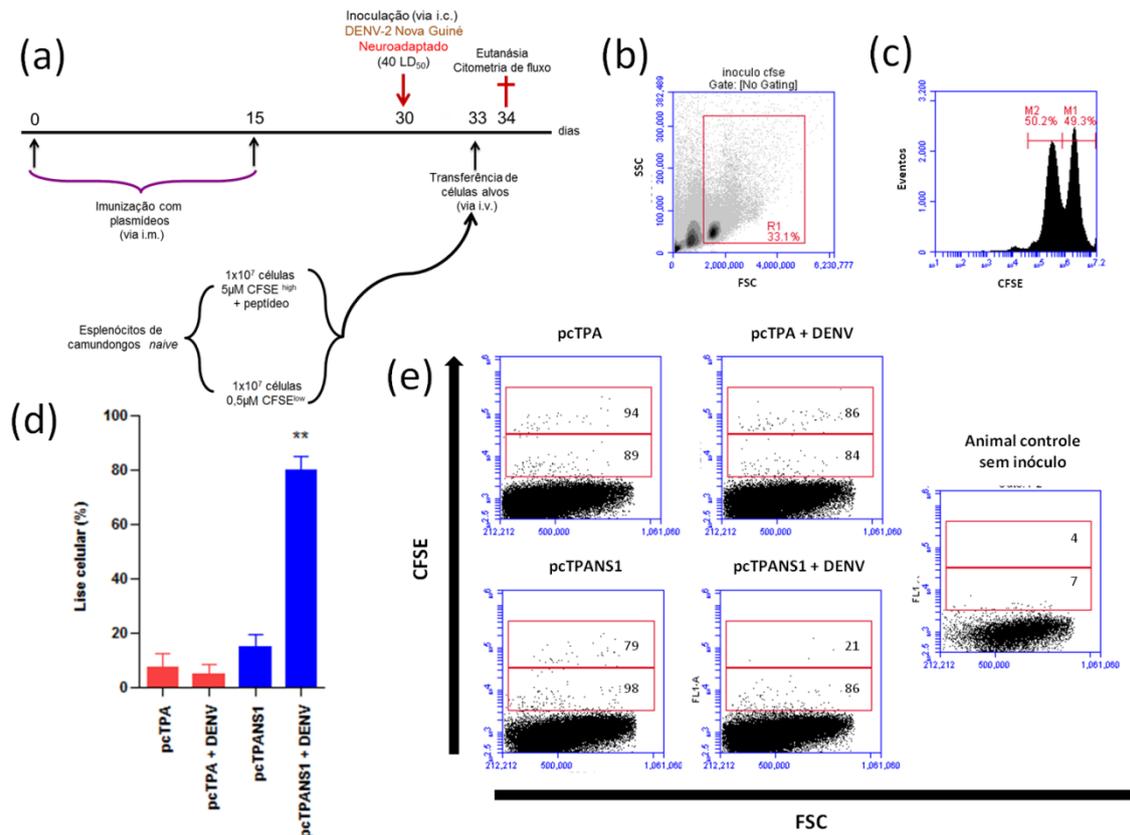


Figura 4.18: Ensaio de Citotoxicidade *in vivo*: (a) Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Grupos de animais BALB/c inoculados com o pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não com DENV2 (40 LD₅₀), receberam uma mistura de esplenócitos provenientes de outros camundongos *naive* incubados com 0,5 μM de CFSE (low) e com 5 μM de CFSE (high) estimulados *in vitro* com peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³. Vinte horas após a transferência das células, os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos avaliados por citometria de fluxo. (b) *Dot plot* representativo da mistura de esplenócitos inoculada nos camundongos imunizados. Em R1 estão representados os esplenócitos viáveis. (c) Histograma evidenciando as populações CFSE^{high} (M1) e CFSE^{low} (M2), contidas em R1. (d) Percentagem de lise celular observada nos grupos estudados, calculado como: Lise Celular (%) = (1 - CFSE^{high}/CFSE^{low}) x 100. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (barras). Asterisco representa diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos, usando o teste de Mann-Whitney (** p<0,01). (e) *Dot plot* representativo das células CFSE^{high} e CFSE^{low} recuperadas dos diferentes grupos de animais. Valores representam o número de eventos CFSE positivos, normalizados para 20.000 esplenócitos.

Para avaliar a população de células T envolvida na lise de células alvo observadas nos animais vacinados com pcTPANS1, específicas para o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ delineamos um ensaio de citotoxicidade *in vivo* seguido de depleção e desafio (fig. 19a), visto que o maior percentual de lise foi observado 72 horas após o desafio com DENV2, em que aproximadamente 80 % das células alvo pulsadas como o peptídeo foram lisadas. Neste ensaio, os animais imunizados com pcTPANS1 ou pcTPA foram submetidos ao tratamento para depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺, antes e após o desafio com DENV2. Como podemos observar na figura 4.19.b, os maiores percentuais

de lise das células alvo pulsadas com o peptídeo foram verificados nos animais vacinados (83,5 %), assim como no grupo de camundongos vacinados e depletados de células TCD4⁻ (83,7 %). Esses dados demonstram que a atividade citotóxica específica para o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ é atribuída à população de células TCD8⁺, pois quando analisamos os resultados obtidos com animais imunizados e depletados de células TCD8⁻, o percentual de lise foi reduzido para 37,9 %, corroborando os dados da literatura que descreve este peptídeo como específico para células TCD8⁺. Entretanto, não podemos descartar a atividade citotóxica das células TCD4⁺, uma vez que nos animais depletados de células TCD8⁻ (fig.4.19.b), observamos que o percentual de lise foi quase o dobro do detectado nos animais imunizados com o plasmídeo controle pcTPA (37,9 % e 20,3 %).

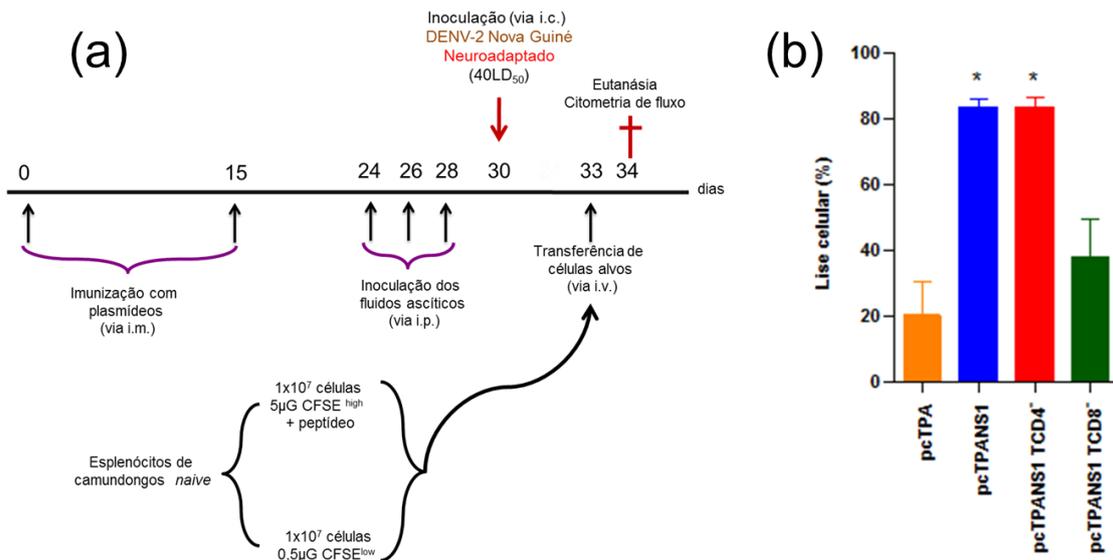


Figura 4.19: Ensaio de Citotoxicidade *in vivo* com depleção de células CD4⁺ e CD8⁺: (a) Representação esquemática do ensaio. Esplenócitos de animais *naive* foram marcados com CFSE high e low e transferidos para animais imunizados, conforme descrito na figura 14. Os animais imunizados com pcTPANS1 ou pcTPA foram submetidos ao tratamento para depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺, antes e após o desafio com DENV2 (40 LD₅₀). (b) Percentagem de lise celular observada nos grupos estudados, calculada como descrito na figura 14. Valores foram expressos em média e desvio padrão (barras). Asterisco representa diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos, usando o teste de Mann-Whitney (* p<0,05).

4.8 Avaliações do papel de anticorpos anti-NS1 na patogênese da dengue

Alguns estudos sugerem que anticorpos contra a proteína NS1 podem ter um papel na patogênese da dengue (revisto por Wan, *et.al.*, 2013). Entretanto, a maior parte destes estudos utilizou anticorpos gerados contra a proteína NS1 expressa em bactérias e que reconhecem epítomos lineares desta proteína. Sendo assim, decidimos avaliar a reatividade dos anticorpos gerados a partir da imunização com a vacina de DNA pcTPANS1 com células do tecido hepático e se essa construção também poderia gerar tais danos.

Um grupo de cinco camundongos foi imunizado com a vacina pcTPANS1 para obtenção de soros. Estes soros foram testados por ELISA para detecção de anticorpos anti-NS1, utilizando a proteína de NS1 expressa em *E. coli* re-enovelada ou desnaturada por calor. Os resultados mostraram que os anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1 só reconhecem a proteína re-enovelada (fig. 4.22). Este resultado confirma estudos anteriores, demonstrando que os anticorpos gerados com vacina pcTPANS1 reconhecem predominantemente epítomos conformacionais da proteína NS1.

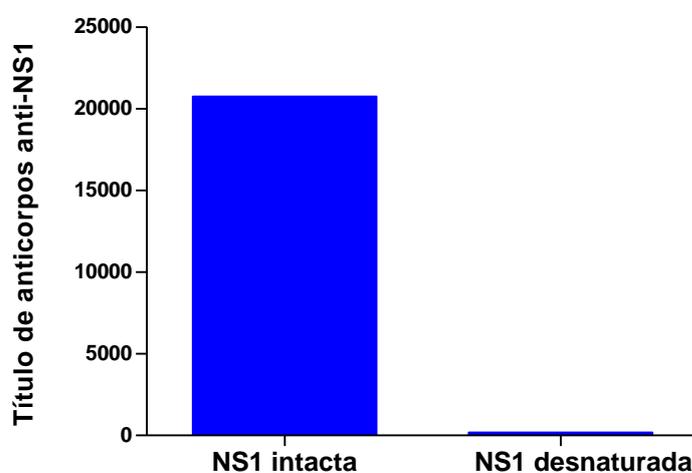


Figura 4.20 Títulos de anticorpos específicos anti-NS1 no pool de soros (n=5) de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando como fase sólida a proteína NS1 expressa em *E.coli* re-enovelada ou desnaturada.

Continuando esta linha de investigação, camundongos *naives* foram inoculados por via i.p com 200 μ l do *pool* de soros provenientes de animais imunizados com os plasmídeos pcTPANS1 ou pcTPA. Após 48 horas, esses animais foram submetidos à eutanásia e o sangue foi coletado para obtenção de soro para a dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST. Tais

quantificações foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis alterações na função hepática desses animais. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos de animais imunizados com a vacina pcTPANS1 ou o plasmídeo controle pcTPA (fig.4.23).

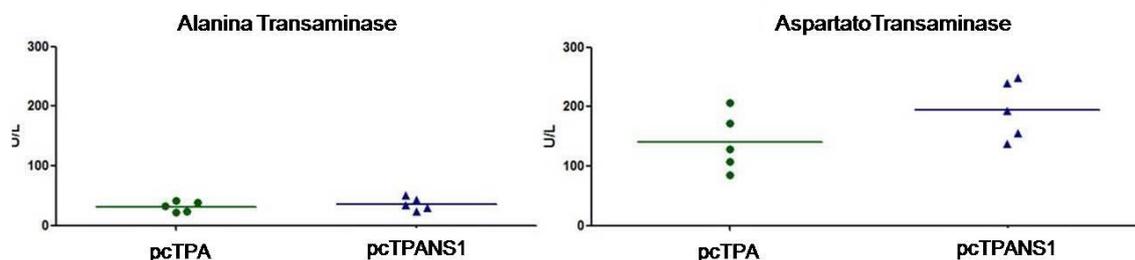


Figura 4.21: Níveis séricos de ALT e AST em animais *naïves* inoculados com soro de camundongos previamente imunizados com o plasmídeo pcTPA ou com a vacina pcTPANS1. A concentração de ALT e AST estão expressas em unidades por litro (U/L), a qual foi calculada com base na detecção de produtos da reação enzimática a 567nm utilizando aparelho REFLOTRON®. Cada ponto representa a quantificação em cada animal e a barra horizontal representa a média das determinações.

Em seguida, foi realizado um estudo para verificar a reatividade de anticorpos anti-NS1, gerados com a vacina pcTPANS1 contra estruturas de camundongos *naïves*. Os soros obtidos dos animais imunizados com a vacina pcTPANS1, assim como os soros controles (de animais inoculados com o plasmídeo pcTPA ou soro pré-imune), foram incubados com cortes histológicos do fígado de um camundongo *naïve* e revelados com o sistema biotina-estreptavidina e AEC. Não foram detectadas marcações no endotélio da veia centro lobular e veia porta, nos ductos linfáticos, assim como em hepatócitos (fig. 4.24). Esses resultados sugerem que a vacina pcTPANS1 não induz a geração de autoanticorpos contra o tecido hepático.

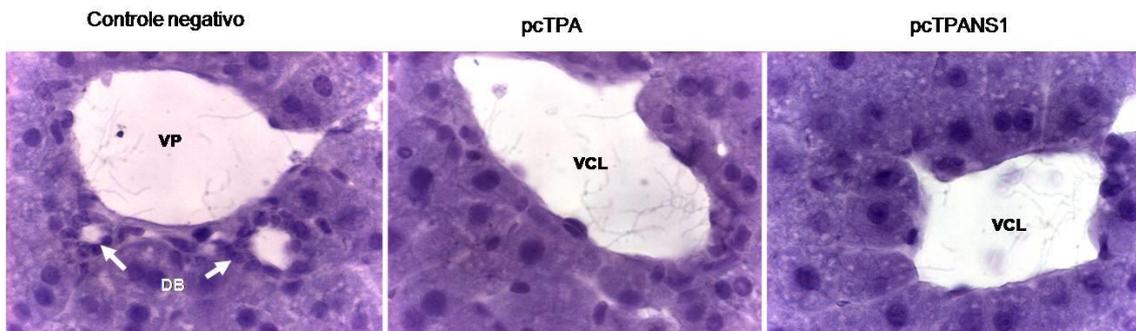


Figura 4.22: Fotomicrografias de cortes de parafina do fígado de um camundongo *naive*, incubado com o soro de animais imunizados com: a vacina pcTPANS1; o plasmídeo controle pcTPA; ou o soro de pré-imune. Visualização por microscopia óptica de campo claro, aumento de 1000x. VP = veia porta; VCL = veia centrolobular; DB = ducto biliar; DL = ducto linfático.

5 Discussão

A dengue é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade entre as doenças causadas por arbovírus em humanos (Gubler, 2002). O único método atualmente disponível para prevenir as infecções por dengue é o controle do mosquito vetor, *Aedes aegypti*. Entretanto, este método se mostra oneroso e freqüentemente impraticável (Halstead & Deen, 2002). Por outro lado, sabe-se que o método realmente eficiente para combater as infecções virais é a vacinação. No caso da dengue, estas vacinas precisam ser protetoras contra os quatro sorotipos virais, pois uma resposta imune ineficiente contra um ou mais vírus pode ser um fator de risco levando à FHD. Além disso, uma vacina contra dengue precisa ser economicamente viável para imunização de populações nos países em desenvolvimento, que são os mais afetados pela doença. Apesar dos esforços de grupos de pesquisas que trabalham em várias frentes no desenvolvimento de vacinas contra dengue, atualmente ainda não há uma vacina comercialmente disponível.

Alguns grupos têm utilizado vacinas de DNA como estratégia para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue (Beaumier *et al.*, 2013). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na proteção proporcionada por tais vacinas. A compreensão dos fenômenos imunológicos envolvidos na imunidade induzida com uma vacina contra dengue é de grande importância, não só do ponto de vista da proteção, mas também pelo fato de que respostas imunes contra este patógeno podem ser responsáveis pelo desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença observadas em humanos.

A vacina de DNA pcTPANS1, previamente construída pelo nosso grupo e testada em camundongos, é capaz de gerar níveis elevados de anticorpos anti-NS1 e induziu proteção em cerca de 100 % dos animais desafiados com DENV2 (Costa *et.al.* 2006 b e c).

Neste sentido, essa tese teve como objetivo o mapeamento da resposta imune protetora gerada pela vacina de DNA pcTPANS1 em um modelo murino. Inicialmente, avaliamos a participação da resposta humoral induzida pela vacina pcTPANS1 na proteção. Delineamos um ensaio de imunização passiva com o soro de animais previamente vacinados, seguido de desafio com DENV2. Observamos que 50 % dos animais que receberam o soro de outros camundongos imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 sobreviveram à

infecção. Os animais que sobreviveram ao desafio não apresentaram nenhum grau de morbidade. Resultados semelhantes foram descritos por Henchal e colaboradores (1988), que mostraram proteção parcial em camundongos previamente inoculados com anticorpos anti-NS1.

Ao avaliarmos os títulos de anticorpos anti-NS1 nos animais imunizados passivamente verificamos, conforme o esperado, a manutenção de níveis baixos de anticorpos ao longo do experimento, diferente do que ocorreu nos camundongos vacinados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2, que apresentam um aumento significativo da resposta imune humoral. Vale lembrar que a vacina pcTPANS1 se baseia na expressão de NS1 que é uma proteína não estrutural do vírus, portanto, para a ativação de uma resposta imune secundária após o desafio não basta à presença do vírus, sendo necessário que ocorra algum nível de replicação viral para a ativação das células de memória específicas para NS1. Estudos anteriores do grupo (Costa *et al* 2006 a, b e c) já haviam demonstrado tal resposta, com um aumento significativo de anticorpos anti-NS1 após o desafio com DENV2. Além disso, os dados obtidos com a imunização passiva sugerem que a alta porcentagem de sobrevivência observada nos animais vacinados com o pcTPANS1 não pode ser explicada simplesmente pelo aumento dos níveis de anticorpos anti-NS1 após o desafio, uma vez que os camundongos inoculados com o soro pcTPANS1 que sobreviveram ao desafio não apresentaram este aumento.

Outro experimento de transferência passiva de anticorpos foi realizado após a obtenção do segundo estoque viral para desafio. Os cálculos da LD₅₀ indicaram que este estoque era muito mais virulento que o primeiro, levando a 100 % de mortalidade no décimo dia pós-desafio nos animais infectados com a dose de 10⁰, enquanto que 40 % dos camundongos inoculados com o primeiro estoque na mesma diluição sobreviveram à infecção. Conseqüentemente, no segundo ensaio de imunização passiva, os resultados obtidos não foram semelhantes ao do primeiro teste. Todos os grupos de animais apresentaram altas taxas de mortalidade e fortes sinais clínicos da infecção, com exceção do grupo de camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1. Portanto, nossos resultados sugerem que a proteção induzida somente pela presença de anticorpos anti-NS1 é parcial e está intimamente ligada à virulência do estoque viral utilizado nos desafios, pois quando utilizamos amostras mais virulentas tal

proteção foi perdida. Neste segundo ensaio de imunização passiva também quantificamos os níveis de anticorpos anti-NS1 dos animais que sobreviveram ao desafio e, como no ensaio anterior, os camundongos que foram imunizados passivamente apresentaram baixos títulos de anticorpos. Este resultado é importante porque difere do descrito na literatura, mostrando que somente a resposta humoral não é capaz de conferir proteção contra desafios com altas doses letais do vírus.

Dando continuidade ao mapeamento da resposta imune induzida pela vacina pcTPANS1, a segunda fase do nosso estudo focou na avaliação da resposta celular. Vários artigos apontam a importância dos linfócitos T na resposta imune protetora, reduzindo o número de células infectadas com o vírus e conferindo, portanto, proteção contra reinfecção (Libraty *et al.*, 2002).

Para avaliarmos o envolvimento dos linfócitos T na proteção mediada pela vacina pcTPANS1, realizamos um ensaio de depleção *in vivo* das células TCD4⁺ e/ou TCD8⁺ após as imunizações, seguido do desafio com DENV2. Verificamos que todos os animais cuja população de células TCD4⁺ foi depletada sucumbiram ao desafio, enquanto que 60 % dos camundongos que foram depletados de células TCD8⁺ sobreviveram à infecção. A análise dos níveis de anticorpos anti-NS1 nos animais depletados de células TCD8⁺, que sobreviveram ao desafio, mostrou um aumento, indicando, portanto, a preservação de uma resposta imune humoral secundária.

Estes resultados sugerem que as células TCD4⁺ parecem ser fundamentais no mecanismo de proteção induzido pela vacina no nosso modelo de desafio. Por outro lado, células TCD8⁺ parecem também ter alguma importância na proteção, embora esta seja marginal quando comparado à função dos linfócitos TCD4⁺. Os resultados obtidos neste ensaio contrariam o que se tem descrito na literatura, que atribui um papel importante das células TCD8⁺ no *clearance* viral devido à sua capacidade citotóxica (Yauch, *et. al*, 2009). Contudo nossos resultados corroboram com o estudo realizado por Gil *et. al*, (2012), que realizaram um ensaio de depleção, seguido de desafio intracerebral, em animais imunizados com NLPs (do inglês *nucleocapsid-like particles*) de DENV. Neste estudo os autores verificaram que apenas 10 % dos animais depletados de células CD4⁺ e 40 % dos animais depletados de TCD8⁺ sobreviveram ao desafio intracerebral.

O próximo passo no desenvolvimento do nosso projeto foi investigar a proteção mediada pela transferência adotiva de células TCD4⁺ e ou TCD8⁺. Para a realização deste ensaio, inicialmente animais foram imunizados com duas doses da vacina pcTPANS1 e submetidos à eutanásia no momento em que seriam desafiados com o vírus (duas semanas após a segunda dose de DNA). Em seguida, os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ destes animais foram isolados e inoculados em outros grupos de camundongos *naives*, com a inoculação concomitante ou não de soro anti-NS1. Nossos resultados mostraram que 55 % dos animais que receberam concomitantemente linfócitos TCD4⁺ e soro (somente uma dose), provenientes de animais imunizados com a vacina pcTPANS1, sobreviveram ao desafio com o estoque de DENV2 mais virulento (40 LD₅₀). Tal resultado corrobora os dados obtidos com o ensaio de depleção *in vivo*, demonstrando mais uma vez a importância das células TCD4⁺ na proteção desta vacina.

Contudo, nesse estudo observamos que os anticorpos anti-NS1 também são essenciais para a proteção mediada por células TCD4⁺. Entretanto, nesse ensaio utilizamos o soro dos animais vacinados com o pcTPANS1 e não anticorpos anti-NS1 purificados. Diante disto, consideramos que um fator importante a ser analisado seria o perfil de citocinas no soro dos camundongos inoculados com a vacina pcTPANS1, pois a administração de níveis elevados destas citocinas poderia estar influenciando os resultados obtidos. Sendo assim, quantificamos os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-10 e não detectamos nenhum aumento significativo destas citocinas após a imunização com o pcTPANS1. Ao contrário, detectamos uma diminuição dos níveis de algumas citocinas, como IL-6 e TNF- α , no soro dos animais imunizados com a vacina pcTPANS1, quando comparados com os soros de animais *naive*. Deste modo, a proteção conferida pela combinação de células TCD4⁺ e soro, deve ser devido à presença de anticorpos neste soro e não dos mediadores da resposta imune.

Entretanto, a função exercida pelas células TCD4⁺ neste processo ainda não está clara. Essa proteção poderia ser mediada pela produção de IFN- γ levando à ativação de células TCD8⁺ citotóxicas. Mas neste caso seria esperado observar uma proteção maior no grupo de animais que receberam a combinação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, o que não foi observado. Por outro

lado, os linfócitos TCD4⁺ poderiam estar atuando não somente na modulação da resposta imune, mas também participando ativamente em fenômenos de citotoxicidade. De fato, alguns estudos em humanos demonstraram a ativação de linfócitos TCD4⁺ citotóxicos em pacientes durante a infecção com DENV (Berrios *et.al.*,1996). Entretanto, os animais que receberam somente as células TCD4⁺, sem anticorpos anti-NS1, não sobreviveram ao desafio. Tal dado sugere uma função citotóxica dos linfócitos TCD4⁺ com envolvimento de anticorpos. Vale ressaltar que, os animais inoculados concomitantemente com linfócitos TCD8⁺ e soro não sobreviveram ao desafio, descartando mais uma vez a possibilidade da proteção ter sido causada somente pela presença dos anticorpos anti-NS1.

Outra possibilidade seria a participação de células NK na proteção observada. Sabe-se que células TCD4⁺ desempenham um papel central na orquestração de funções efetoras de outras células do sistema imunológico (Cichocki *et.al.*,2013). Horowitz e colaboradores em 2010 descreveram o *cross-talk in vitro* entre células NK e células TCD4⁺ durante a infecção por *Plasmodium falciparum*, no qual eles mostraram que a produção de IL-2 pelas células TCD4⁺ foi essencial para a ativação das células NK, resultando no aumento da produção IFN- γ . Em outro artigo publicado este ano, foi demonstrado *in vivo* que as células TCD4⁺ de memória aumentam significativamente a produção de granzima B e perforina em células NK, sugerindo um papel na proteção contra a infecção por *Pneumocystis murina* (Kelly *et.al.*, 2013). Logo, isso poderia explicar a proteção mediada por essa vacina com a presença de anticorpos e interação entre as células TCD4⁺ e NK.

Outro resultado importante foi o fato de não ter diferença estatística entre o grupo de animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e os animais que receberam concomitantemente linfócitos TCD4⁺ e soro no que se refere a curva de sobrevivência e morbidade, com a utilização do segundo estoque viral (40 LD₅₀) nos desafios. Este resultado mostra que a proteção gerada com esta vacina está relacionada principalmente com a ativação de células TCD4⁺ e anticorpos. Por outro lado, a avaliação dos títulos de anticorpos anti-NS1 nos animais inoculados com células TCD4⁺ e soro que sobreviveram ao desafio, mostrou níveis de anticorpos similares ao do pool de soros pcTPANS1 administrados nos animais. Este resultado mostra que não houve um *reforço*

na resposta humoral, como ocorre com os animais imunizados com a vacina pcTPANS1 após o desafio com DENV2, descartando a possibilidade da participação de células B residuais (cerca de 4 %) na transferência dos linfócitos T que pudesse afetar os resultados obtidos.

A secreção de IFN- γ é importante durante o curso de infecções virais para mediar a resposta imune. Estudos anteriores relatam uma relação entre a atividade citotóxica de células TCD8⁺ e secreção de IFN- γ na proteção (Yauch *et al.* 2009). Esta citocina tem sido descrita como um mediador da resposta imune celular, desempenhando um papel importante na atividade anti-viral contra DENV (Shresta, *et.al.* 2004). A secreção de IFN- γ estimulada pela vacina pcTPANS1 foi avaliada no ensaio de ELISPOT, utilizando o peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, contido na proteína NS1 de DENV2 e descrito por Gao e colaboradores (2008) como específico para células TCD8⁺. As células obtidas do baço de animais vacinados com o plasmídeo pcTPANS1 foram reativas a este peptídeo e secretaram IFN- γ . Esses resultados indicam que a vacina pcTPANS1 é capaz induzir uma resposta imune celular.

Seguindo a linha de investigação da resposta celular, avaliamos a capacidade funcional efetora das células provenientes de animais imunizados com a vacina pcTPANS1. Realizamos um ensaio de citotoxicidade *in vivo*, no qual grupos de animais BALB/c inoculados com o pcTPANS1 ou pcTPA, desafiados ou não com DENV2 (40 LD₅₀), receberam uma mistura de esplenócitos provenientes de outros camundongos *naïve* incubados com CFSE e pulsados *in vitro* com peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³. Nossos resultados mostram que os camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 promoveram a lise de 15,1 % das células alvo. Além disso, quando as células alvos foram administradas 72 horas após o desafio com DENV2, houve um aumento significativo do percentual de lise de aproximadamente 80 %. Estes resultados demonstram que a vacina pcTPANS1 é capaz de induzir a produção de células de memória com atividade citotóxicas, visto que a sua atividade de lise é aumentada 5,3 vezes, após ao desafio com DENV2.

Em outro ensaio semelhante ao descrito acima, os animais foram imunizados com pcTPANS1 e submetidos ao tratamento para depleção de células CD4⁺ ou CD8⁺, antes e após o desafio com DENV2. Os resultados

demonstraram que a depleção de células CD4⁺ não alterou o percentual de lise das células alvo pulsadas com o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, enquanto que a depleção de CD8⁺ diminuiu significativamente esta lise. Esses dados demonstram que a atividade citotóxica específica para o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ é atribuída principalmente à população de células TCD8⁺, corroborando os dados da literatura que descreve este peptídeo como específico para tais células. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de alguma atividade citotóxica também de células TCD4⁺ específicas para este peptídeo, uma vez que observamos que nos animais depletados de células CD8 o percentual de lise foi quase o dobro do detectado nos animais inoculados somente com o plasmídeo controle pcTPA. Esse dado sugere que mesmo usando um peptídeo menor e específico para células TCD8⁺, tal sequência pode ser capaz de promover uma atividade citotóxica das células TCD4⁺.

As manifestações das formas mais graves da dengue incluem trombocitopenia, derrame vascular e danos no fígado. Várias evidências mostram que a lesão hepática está envolvida na patogênese da infecção por dengue, no entanto, os mecanismos que levam a este fenômeno não estão esclarecidos. Alguns estudos relacionados a desordens auto-imunes na infecção pelo vírus dengue apontam a geração de auto-anticorpos como um fator importante na patogênese. A proteína NS1 é conhecida por ser um dos principais alvos da resposta imune humoral, e concentrações elevadas de anticorpos anti-NS1 foram detectados em pacientes com a doença na sua forma mais grave. Além disso, alguns estudos sugerem que anticorpos gerados contra a proteína NS1 reagem cruzadamente com estruturas do hospedeiro, tais como: plaquetas, células endoteliais, fibrinogênio (Nielsen, 2009). Um estudo realizado por Lin e colaboradores (2008) mostrou que a administração passiva de anticorpos anti-NS1 gerados contra NS1 recombinante expressa em *Escherichia coli*, assim como a imunização direta com esta proteína, induziram danos em células endoteliais hepáticas, resultando em níveis séricos elevados das enzimas aspartato-amino-transferase (AST) e alanina-amino-transferase (ALT) e infiltração de monócitos (Lin *et al.*, 2008). Entretanto, a maior parte destes estudos utiliza anticorpos policlonais gerados contra a NS1 expressa em *E. coli*, ou anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos lineares desta

proteína (Lin *et.al.*, 2003, Avirutnan *et.al.*, 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo murino, sugerem a existência de um mecanismo de mimetismo molecular em que os anticorpos anti-NS1 de DENV reagem cruzadamente com as células endoteliais e inflamatórias levando à ativação e à apoptose destas células (Lin *et.al.*, 2002).

Diante destes estudos, resolvemos investigar um possível efeito deletério dos anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1. Os anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1 reconhecem predominantemente epítomos conformacionais da proteína NS1 (Costa *et.al.*, 2006a), enquanto que as imunoglobulinas induzidas com a imunização com a NS1 expressa em bactéria, sem um tratamento específico de re-enovelamento (Amorim, *et.al.* 2010), reconhecem principalmente epítomos lineares desta proteína. As análises de cortes histológicos do fígado de um camundongo *naive* incubado com o pool de soros provenientes de animais inoculados com a vacina de DNA pcTPANS1 não demonstraram reatividade a estruturas hepáticas como células endoteliais da veia centro lobular, da veia porta e dos ductos linfáticos, assim como hepatócitos. Também não detectamos danos no tecido hepático dos animais vacinados com o pcTPANS1, assim como nos que receberam o soro de outros camundongos previamente imunizados. Além disso, não verificamos um aumento nos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST nesses animais. Portanto, os anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1 aparentemente não induzem tais danos por não induzir auto-anticorpos. Estas diferenças parecem estar correlacionadas principalmente com o sítio de reconhecimento dos anticorpos gerados, contra epítomos conformacionais ou lineares da proteína NS1. Portanto, os epítomos lineares presentes na proteína NS1 devem existir também em algumas proteínas do hospedeiro e, conseqüentemente, os anticorpos gerados contra tais regiões podem reagir com estas estruturas nas células do indivíduo, levando a algumas lesões tissulares.

Além disso, observamos que a vacina pcTPANS1 não promove uma exacerbação dos níveis séricos de diversas citocinas detectadas em pacientes com quadros graves da doença, efeito este denominado de “tempestade” ou “Tsunami” de citocinas (*cytokine storm*) (Basu & Chaturvedi, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Ao que parece a vacina pcTPANS1 promove uma resposta equilibrada destas citocinas.

6 Conclusões

Os anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1 atuam na proteção contra o desafio com DENV2 por via intracerebral, mas estes anticorpos sozinhos não foram capazes de conferir proteção quando utilizamos um estoque viral mais virulento;

A depleção de células CD4⁺ nos animais imunizados com o pcTPANS1 aboliu a proteção conferida por esta vacina;

Houve proteção parcial nos camundongos imunizados e depletados de células CD8⁺ que foram desafiados com DENV2;

Células TCD4⁺ juntamente com soro, provenientes de animais previamente imunizados com a vacina de DNA pcTPANS1, protegeram camundongos *naïves* submetidos ao desafio com DENV2;

Não houve diferença estatística no que se refere às curvas de sobrevivência e morbidade entre os grupos de animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e os animais que receberam concomitantemente linfócitos TCD4⁺ e soro;

A vacina pcTPANS1 induziu células que secretam IFN- γ após o estímulo com o peptídeo ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, presente na proteína NS1 de DENV2;

A vacina pcTPANS1 gerou células com atividade citotóxicas *in vivo* contra células alvo que apresentavam o peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³;

A imunização com a vacina pcTPANS1 não promoveu um aumento de citocinas séricas;

Não houve reatividade cruzada de anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1 em cortes histológicos do fígado de camundongo *naïve*;

Não ocorreram alterações histopatológicas no fígado dos animais imunizados com a vacina pcTPANS1 ou inoculados somente com o soro, assim como nos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST.

Neste trabalho podemos concluir que a vacina pcTPANS1 confere proteção e esta proteção é mediada principalmente por células TCD4⁺ e anticorpos.

7 Perspectivas

Avaliar o papel do sistema de complemento na lise de células infectadas com DENV2 mediada por anticorpos gerados com a vacina pcTPANS1;

Investigar a possível participação das células NK na proteção mediada pela vacina pcTPANS1;

Utilização de uma biblioteca de peptídeos para o mapeamento de epítomos imunodominantes, a partir da sequência aminoácidos da glicoproteína NS1 do DENV2.

8 Referências Bibliográficas

- Alves AM, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC. 2000. DNA immunisation against the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine*. 19(7-8): 788-795.
- Amorim JH; Porchia BFMM. ; Balan A; Cavalcante RCM.; Costa, SM ; Alves AMB, Alves AM ; de Souza Ferreira LC. 2010. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of Virological Methods*, v. 167, p. 186-192.
- Angel, JB.; Cooper, CL.; Clinch, J.; Young, CD.; Chenier, A.; Parato, KG.; Lautru, M. Davis, H.; Cameron, DW. 2008. CpG increases vaccine antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection. *J Immune Based Ther Vaccines*; 6:4.
- Anwar A, Chandrasekaran A, Ng ML, Marques E, August JT. 2005. West Nile pre-membrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. *Virology*. 332(1): 66-77.
- Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. 2003. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*;35: 33-42.
- Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*; 161:6338–46.
- Avirutnan P; Punyadee N; Noisakran S; Komoltri, C; Thienneca S.; Auethavornanan K; Jairungsri A; Kanlaya, R, Tangthawornchaikul N; Puttinhunt C; Pattanakitsakul,SN; Yenchitsomanus, P. T.; Mongkolsapaya, J Kasinrerak, W.; Sittisombut,N.; Husmann, M.; Blettner M.; Vasanaawathana, S.; Bhakdi, S.; Malasit, P. 2006b. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis.*, v. 193, n. 8, p. 1078-1088.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. 2006. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol*. 143(2):345-56.
- Azevedo AS, Gonçalves AJ, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AM. 2013. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One*.;8(3):
- Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, Alves AM. 2011. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on

- truncate envelope protein or its domain III PLoS One. 2011;6(7):e20528. doi: 10.1371/journal.pone.0020528. .
- Bagarazzi, M.L.; Boyer, J.D.; Javadian, M.A.; Chattergoon, M.; Dang, K.; Kim, G.; Shah, J.; Wang, B.; Weiner, D.B. 1997 Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *J. Med. Primatol.* Feb-Apr;26(1- 2):27-33.
- Barrett AD. 2001. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 951:262-71.
- Bashyam HS, Green S, Rothman AL. 2006. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol.* 176(5):2817-24.
- Basu A & Chaturvedi UC. 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53(3):287-99.
- Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. 2013. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res.* "2013Apr" 8. pii: S1931-5244(13)00079-0
- Becker, P.D.; Noerder, M.; Guzman, C.A. 2008. Genetic Immunization: Bacteria as DNA vaccine delivery vehicle. Capitulo 6 (71-97) In Sleator, R. e Hill, C. *Patho-biotechnology: Biotechnology intelligence unit.* Landes Bioscience, 216 p.
- Bente DA & Rico-Hesse R. 2006. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models.*;3(1):97-103.
- Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. 2005. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol.* Nov;79(21):13797-9.
- Berrios V, Kurane I, Ennis FA. 1996. Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immunol Invest.* 1996 May;25(3):231-40.
- Besse, F. & Ephrussi, A. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9:971-80.
- Blaney JE Jr, Hanson CT, Firestone CY, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. 2004. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg.* 71(6):811-21.
- Block OK, Rodrigo WW, Quinn M, Jin X, Rose RC, Schlesinger JJ. 2010. A tetravalent recombinant dengue domain III protein vaccine stimulates neutralizing and enhancing antibodies in mice. *Vaccine.* 28(51): 8085-94.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T,

- Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Apr 25;496(7446):504-7
- Bordignon J, Strottmann DM, Mosimann AL, Probst CM, Stella V, Noronha L, Zanata SM, Dos Santos CN. 2007. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *J Med Virol*. 79(10):1506-17.
- Brandt WE, Chiewslip D, Harris DL, Russell PK. 1970. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. *J Immunol*. 105(6):1565-8
- BRASIL. Informe epidemiológico Dengue - semana epidemiológica 1 a 39 de 2011. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.
- Brave, A.; Hallengard, D.; Schroder, U.; Blomberg, P.; Wahren, B.; Hinkula, J. 2008 Intranasal immunization of young mice with a multigene HIV-1 vaccine in combination with the N3 adjuvant induces mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*; 26:5075-8.
- Castro-Jorge, L. A.; Machado, P. R. L.; Favero, C. A.; Borges, M. C.; Passos, L. M. R.; Oliveira, R. M.; Fonseca, B. A. L. 2010. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *Journal of Medical Virology*. v. 82, p. 1400-1405.
- Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira II, Jabor AV, Bonaldo MC, Freire MS, Galler R. 2001. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res*. 79:1-14.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. 1990. *Annu. Rev. Microbiol*. 44: 649-688.
- Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH, Tang SS, *et al*. 2002 Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine glycine aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *J Infect Dis*;186:743-51.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. 2006. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 47(2): 155-66.
- Chen HC, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, Chen YC, Kao CL, King CC, Wu-Hsieh BA. 2004. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J. Med. Virol*. 73: 419-431.
- Chen L, Ewing D, Subramanian H, Block K, Rayner J, Alterson KD, Sedegah M, Hayes C, Porter K, Raviprakash K. 2007. A heterologous DNA prime-

Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle boost dengue vaccine regimen affords complete protection from virus challenge in cynomolgus macaques. *J Virol.* 81(21):11634-9.

Chong, S.Y.; Egan, M.A.; Kutzler, M.A.; Megati, S.; Masood, A.; Roopchand, V.; Garcia-Hand, D.; Montefiori, D.C.; Quiroz, J.; Rosati, M., Schadeck, E.B.; Boyer, J.D.; Pavlakis, G.N.; Weiner, D.B.; Sidhu, M.; Eldridge, J.H.; Israel, Z.R. 2007. Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine*; 25:4967-82

Chuansumrit, A.; Chaiyaratana, W.; Pongthanapisith, V.; Tangnararatchakit, K.; Lerwongrath, S.; Yoksan, S. 2008. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr. Infect. Dis. J. V.* 27, n.1, p. 43-48.

Chungue E, Poli L, Roche C, Gestas P, Glaziou P, Markoff LJ. 1994. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Infect Dis* 170:1304-7.

Churdboon-chart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. 1991. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* ;44(5):481-93.

Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. 2013. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol.* 4:55.

Cichocki,F., Miller J.S., Anderson, S.K., Bryceson,Y.T. 2013. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions *Front Immunol.*; 4: 55.

Cleaves, G. R., Ryan, T. E. & Schlesinger, R. W. 1981. Identification and characterization of dengue type 2 virus replicative intermediate and replicative form RNA's. *Virology*,111, 73 83

Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G et al. 2010. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine.* 28: 2705-15.

Clyde K, Kile JL, Harris E. 2006. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.*, v. 80, n. 23, p. 11418-11431.

Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. 2005. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 79(2):853 - 859.

Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. 2006c DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*, v. 358, p. 413-423.

- Costa SM, Freire MS, Alves AM. 2006b. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 24 (21): 4562-4.
- Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JL, Armoa GR, Freire MS, Alves AM. 2006a. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 24 (2) :195-205.
- Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, Motta MA, Freire MS, Alves AM. 2011. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One*.;6(10):e25685.
- Dale, C.J.; Thomson, S.; De Rose, R.; Ranasinghe, C.; Medveczky, C.J.; Pamungkas, J.; Boyle, D.B.; Ramshaw, I.A.; Kent, S.J. 2006 Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med*; 127:171-97.
- Davis HL, McCluskie MJ. 1999. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infect.* 1(1): 7-21.
- de Oliveira França RF, Zucoloto S, Fonseca B.A. 2010. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp. And Mol. Pathol.*; 89(3): 321-326.
- Dobaño C, Rogers WO, Gowda K, Doolan DL. 2007. Targeting antigen to MHC Class I and Class II antigen presentation pathways for malaria DNA vaccines. *Immunol Lett.* 111(2): 92-102
- Donnelly JJ, Wahren, B, Liu MA. 2005. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 175(2): 633-639.
- Duan X, Lu X, Li J, Liu Y. 2008. Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient denguevirus secretion *Biochem Biophys Res Commun.* 373(2):319-24.
- Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. 2000. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol.* 165(5):2850-8.
- Durbin AP, McArthur JH, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K, Murphy BR, Whitehead SS. 2006. rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naïve adults. *Hum Vaccin.* 2(6):255-60.
- Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J, Perreault JR, Blaney JE Jr, Thumar B, Murphy BR, Karron RA. 2005. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis.* 191(5):710-8.

- Edelman R. 2007. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis.* 45: 56-60.
- Edelman R, Hombach J. 2008. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas": summary of a World Health Organization Technical Consultation. *Vaccine.* 26(33):4113-9
- Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Hoft DF. 2011. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.*;5:e983.
- Encke J, zu Putlitz J, Geissler M, Wands JR. 1998. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model. *J Immunol.* 161(9):4917-23.
- Falconar AK & Young PR. 1990. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J Virol Methods.* Dec;30(3):323-32.
- Falconar, A. K. 2007. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLEtype motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin. Vaccine Immunol.* v. 14, n. 5, p. 493-504.
- Falconar, A. K. 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol.* v. 142, n.5, p. 897-916.
- Falkler WA Jr, Diwan AR, Halstead SB. 1973. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *J Immunol.* ;111(6):1804-9.
- Feltquate, D.M. 1998. DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J Cell Biochem; S30–31*:304–11.
- Figueiredo, L.T.M. 2000. The Brazilian Flaviviruses. *Microbes and Infection.*v. 2, n.13, p. 1643-1649,
- Forattini, O.P. *Culicidologia Médica.* 2002. 1ª. Ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. v. 1, 864p. ISBN 85-314-0334-0.
- Forattini,O.P.& Brito, M. 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti* . *Revista de Saúde Pública.* V. 37, n.5, p. 676-677.
- Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, Green S, Rothman AL, Mathew A. 2011. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol.* 89(1):122-9.

- Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med.* 3(6):362-71.
- Fuller, D. H.; Loudon, P.; Schmaljohn, C. 2006. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods, Minnesota*, p.86-97,.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS. 2005. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res.* 38(12):1835-46.
- Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, Wilson JM. 2008. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther.* 19(9):927-36.
- Garmony, H. S.; Brown, K. A.; Titball, R. W. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy, Florida*, v.1, n.2, p.2-5.
- Gil L, Bernardo L, Pavón A, Izquierdo A, Valdés I, Lazo L, Marcos E, Romero Y, Guzmán MG, Guillén G, Hermida L. 2012. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 induce functional serotype-specific cell-mediated immunity in mice. *J Gen Virol.* 93
- Gomes AL, Wee LJ, Khan AM, Gil LH, Marques ET Jr, Calzavara-Silva CE, Tan TW. 2010. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One.* 5 (6):e11267.
- Green, S.; Rothman, A. 2006. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis [S.I.]*, v. 19, n. 5, p. 429-36,
- Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien E, Deubel V, Vorndam V, Osterhaus AD. 1999. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection *Microbes Infect.* 1(13): 1085-90.
- Guabiraba R, Marques RE, Besnard AG, Fagundes CT *et al.* 2010. Role of the chemokine receptor CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLOS One.*; 5(12):e15680.
- Gualano R.C., Pryor MJ, Cauchi MR, Wright PJ, Davidson AD. 1998. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J Gen Virol.*:437-46.
- Gubler D.J. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. in *Dengue and dengue*

hemorrhagic fever. eds Gubler D. J., Kuno G. (CAB International, London, United Kingdom), , pp 1–22.

Gubler D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 11(3):480-96.

Gubler D.J. 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* v, 27, n.5, p. 319-330.

Gubler D.J. 1993. Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis.*;2(6):383-93.

Gubler, D. J. 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: the unholy Trinity of the 21st Century. *Trop. Med. And Health.* v.39,n.4, p3-11,251-3.

Gubler, D.J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10(2):100 – 103

Guimarães, V.; Innocentin, S.; Chatel, J.M.; Lefevre, Langella.; Azevedo, V.; Miyoshi, A. 2009. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy.* 7:4:1-24

Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Soike K, Ratterree M, Monath TP. 2001. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol.* 75(16):7290-304.

Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, Lang J, Ocran S, Mitchell F, Parsons M, Brown N, Brandler S, Fournier C, Barrere B, Rizvi F, Travassos A, Nichols R, Trent D, Monath T2004. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol.*; 78(9):4761-75.

Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. 2000a. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(4):442-7. Review.

Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. 2000b. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann Rev Immunol*;18:927–74.

Guy B & Almond JW. 2008. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 31(2-3):239-52.

Guzman A & Istúriz RE. 2010. Update on the global spread of dengue. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36:suppl 1:s40-42.

- Guzman MG & Kouri G. 2008. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(6):522-3.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*;8(12):S7-16.
- Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. 2010. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis.* Oct;10(10).
- Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 32(1):154-6.
- Halstead SB, Rourke EJ, Allison AC. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *Journal experimental Medicine.* 46: 201-17.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. 1973a. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *J. Infect. Dis.* 128: 7-14.
- Halstead SB, Casals J, Shotwell H, Palumbo N. 1973b. Studies on the immunization of monkeys against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med Hyg.* May;22(3):365-74.
- Halstead SB. Dengue. 2007. *Lancet.*; 370(9599):1644-52.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988; 239: 476-478.
- Halstead, S.B. 1980. Dengue haemorrhagic fever: a public health problem and a field for research. *Bulletin on the World Health Organization.* v. 58, n.1, p. 1-21.
- Harris, E., Holden, K. L., Edgil, D., Polacek, C. & Clyde, K. Molecular biology of flaviviruses. 2006. *Novartis Found Symp.* 277, 23–39.
- Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. 1988. Synergistic interaction of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* 69: 2101-2107.
- Henchal, E. A. & Putnak JR. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol. Rev.* v.3, N.4, p.376-396.
- Herrero, L. J., Zakhary, A., Gahan, M. E., Nelson, M. A., Herring, B. L., Hapel, A. J., Keller, P., Obeysekera, M., Chen, W., Sheng, K., Taylor, A., Wolf, S., Bettadapura, J., Broor, S., Dar, L. & Mahalingam, S. .2013. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors

- involved in disease pathogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*. 137 (2), 266-282.
- Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY, Lai JH. 2005. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol*.174(12):8163-72.
- Holman DH, Wang D, Raviprakash K, Raja NU, Luo M, Zhang J, Porter KR, Dong JY. 2007. Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol*. 14(2):182-9.
- Holmes EC & Twiddy SS. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 3(1): 19-28.
- Horowitz, A., K. C. Newman, J. H. Evans, D. S. Korbel, D. M. Davis, and E. M. Riley. 2010. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Immunol*. 184: 6043–6052.
- Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu,YC. 1999. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*. 57(1): 1-8.
- Huang YH, Chang BI, Lei HY, Liu HS, Liu CC, Wu HL, *et al*. 1997, Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clin Exp Immunol*;110:35-40.
- Ingolotti, M.; Kawalekar, O.; Shedlock, D.J.; Muthumani, K.; Weiner, D.B. 2010 DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines*. Jul; 9(7):747-63.
- Jacobs, M. G.; Robinson, P. L., Bletchly, C.; Mackenzie, J. M.; Young, P. R. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*. v. 14, n. 11, p. 1603-1610.
- Jessie K, Fong MY, Devi S. *et al*. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.*; 189:1411-1418.
- Jimenez RO & Fonseca BAL. 2001. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. *Vaccine*.; 19: 648-654.
- Julander JG, Perry ST, Shresta S. 2011. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother.*; 21(3):105-16.
- Kalinna, B.H. 1997. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunology and Cell Biology*, Camberra, v.75, p.370-375.

- Kanazawa, T.; Takashima, Y.; Hirayama, S.; Okada, H. 2008. Effects of menstrual cycle on gene transfection through mouse vagina for DNA vaccine. *Int J Pharm*; 360:164-70.
- Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, Lai CJ. 1993. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice *J Virol*. Nov;67(11):6567-75
- Kelly MN, Zheng M, Ruan S, Kolls J, D'Souza A, Shellito JE. 2013. Memory CD4+ T cells are required for optimal NK cell effector functions against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol*. Jan 1;190(1):285-95.
- Kent, S.; De Rose, R.; Rollman, E. 2007 Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine. *Curr Opin Investig Drugs*; 8:159-67.
- Khanam S, Pilankatta R, Khanna N, Swaminathan S. 2009. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5. *Immunity. Vaccine*. 27(43):6011-21
- Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. 2007. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol*. 7:10.
- Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. 2000. Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol*. Apr;74(7):3253-63.
- Kim, M.S. & Sin, J.I. 2005. Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model. *Immunology*; 116:255-66.
- Kinney RM & Huang CY. 2001. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology*.;44(2-3):176-97.
- Klinman, D.M.; Takeshita, F.; Kamstrup, S.; Takeshita, S.; Ishii, K.; Ichino, M.; Yamada, H. 2000. DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol. (Basel)* 104, 45–51.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, Hayes C. 1997. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*.; 15(5):547-52.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, et al. 2000. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*; 18:3166-73.
- Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW. 2000. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus pre-membrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine*. 18: 1133-9.

- Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, Juffrie M, Sutaryo J, Van Der Meer GM, Groen J, Osterhaus AD. 2001. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol.* 39(12):4332-8.
- Krieg AM, Davis HL. 2001. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther.* 3(1):15-24.
- Kuhn, R. J.; Zhang, W.; Rossmann, M. G., Pletnev, S. V.; Corver, J.; Lenches, E.; Jones, C.T.; Mukhopadhyay, S.; Chipman, P.R.; Strauss, E. G.; Baker, T. S.; Strauss, J. H. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* v.108, n.5, p. 717-725.
- Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. Structure and assembly of icosahedral enveloped RNA viruses. *Adv Virus Res.* ;64:263-84.
- Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S. 2008 TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev;* 60:795-804.
- Kümmerer BM & Rice CM. 2002. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* May;76(10):4773-84
- Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gómez I. 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J Med Virol.* Oct;32(2):102-8.
- Kurane I, Hebblewaite D, Brandt WE, Ennis FA. 1984. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* 52(1):223-30.
- Kurane I. 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*;30:329–340.
- Kurane I, Ennis FE. 1992. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* Apr;4(2):121-7. Review.
- Kurth, R. 1995. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 772, 140–151.
- Kutzler, M.A. & Weiner, D.B. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics;* 9:776–88.
- Kyle JL, Beatty PR, Harris E. 2007. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis.* 15;195(12):1808-17.
- Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, Rothman AL, Green S. 2007. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis.*; 195(8):1108-16.

- Laughlin, C. A.; Morens, D. M.; Caseti, M. C.; Denis, A. C.; Martin, J. L.; Whitehead, S. S.; Fauci, A. S. 2012. Dengue Research opportunities in the Americas, *The journal of infectious diseases*.
- Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, Guillén G, Guzmán MG. 2007. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine*. 25(6):1064-70.
- Ledwith, B.J.; Manam, S.; Troilo, P.J.; Barnum, A.B.; Pauley, C.J.; Griffiths, T.G. 2nd; Harper, L.B.; Beare, C.M.; Bagdon, W.J.; Nichols, W.W. 2000. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 43, 258–272.
- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 8(5):377-88.
- Leitner WW, Seguin MC, Ballou WR, Seitz JP, Schultz AM, Sheehy MJ, Lyon JA. 1997. Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites. *J Immunol*. 159(12): 6112-6119.
- Li, J.M. & Zhu, D.Y. 2006. Therapeutic DNA vaccines against tuberculosis: a promising but arduous task. *Chin Med J (Engl)*; 119:1103-7.
- Li, K.B.; Zhang, X.G.; Ma, J.; Jia, X.J.; Wang, M.; Dong, J.; Zhang, X.M.; Xu, H.; Shu, Y.L. 2008. Codon optimization of the H5N1 influenza virus HA gene gets high expression in mammalian cells. *Bing Du Xue Bao*; 24:101-5.
- Libraty, D. H.; Young, P. R.; Pickering, D.; Endy, T. P.; Kalayanarooj, S., Green, S.; Vaughn, D. W.; Nisalak, A.; Ennis, F. A., Rothman, A. L. 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J. Infect Dis*. v. 186, n. 8, p. 1165-1168.
- Lima DM, de Paula SO, França RF, Palma PV, Morais FR, Gomes-Ruiz AC, de Aquino MT, da Fonseca BA. 2011. A DNA vaccine candidate encoding the structural prM/E proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection. *Vaccine*. 17;29(4):831-8. Epub Nov 27.
- Lima, M. R. Q.; Nogueira, R. M. R.; Schatzmayr, H. G.; Santos, F. B. 2010. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis*. v.4, p. 738.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*;69:82–90.

- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, *et al.* 2002. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 169:657-64.
- Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. 2008. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab. Invest* 88:1079–1089.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. 2006. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 19:127-32.
- Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. 1998. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol.* . 72(1):191-200.
- Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, *et al.* 2011. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med.* 236:515-23
- Lin, C. F.; Lei, H.Y.; Shiau, A.L.; Liu, H. S.; Yeh, T. M.; Chen, S. H.; Liu, C. C.; Chiu, S. C.; Lin, Y. S. 2002 .Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J. Immunol.*, v. 169, n. 2, p. 657- 664.
- Lin, C.; Chiu, S.; Hsiao, Y.; Wan, S.; Lei, H.; Shiau, A.; Liu, H.; Yeh, T.; Chen, S.; Liu, C.; Lin, Y. 2005. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein. *The Journal of Immunology.* v. 174, p.395-403.
- Lin, S.; Chuang, Y.; Lin, Y.; Lei, H., Liu, H.; Yeh, T. 2012. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *Journal of infection.* v. 64, p. 325-334.
- Lindenbach BD & Rice CM. *Flavirididae: 2001. The viruses and their replication.* In: *Fields Virology.* Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds.), 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia/New York. 991-1024.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. 1997. Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* v. 71, n. 12, p. 9608-9617.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* v. 73, n. 6, p.4611-4621.
- Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. 2007. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol.* Mar;38(3):265-8

- Liu MA, Ulmer JB. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet.*; 55:25-40.
- Liu MA. 2003. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 253(4): 402-410.
- Liu, J.; Chiu, C.; Chen, Y.; Wu, H. 2011. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. *The journal of biological chemistry.* v. 286, n. 11, p. 9726-9736.
- Liu, M.; Acres, B.; Balloul, J. M.; Bizouarne, N.; Paul, S.; Slos, F.; Squiban, P. 2004. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*
- Lori, F.; Calarota, S.A.; Lisziewicz, J. 2007 Nanochemistry-based immunotherapy for HIV-1. *Curr Med Chem*; 14:1911-9.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Honório, N.A.; Castro, M.G.; Schatzmayr, H.G.; Miagostovich, M.P.; Alves, J.C.R.; Silva, W.C; Leite, P.J; Nogueira, R.M.R. 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. *Memória Instituto Oswaldo Cruz.* v. 97, p.799-800.
- Lum LC, Lam SK, Choy YS et al. Dengue Encephalitis: a True Entity? 1996. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 54: 256–259.
- MacGregor, R.R.; Boyer, J.D.; Ciccarelli, R.B.; Ginsberg, R.S.; Weiner, D.B. 2000 Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. *J. Infect. Dis.* Jan; 181(1):406
- MacGregor, R.R.; Boyer, J.D.; Ugen, K.E.; Lacy, K.E.; Gluckman, S.J.; Bagarazzi, M.L.; Chattergoon, M.A.; Baine, Y.; Higgins, T.J.; Ciccarelli, R.B.; Coney, L.R.; Ginsberg, R.S.; Weiner, D.B. 1998. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Infect. Dis.* 178 (1), 92– 100.
- Mairuhu AT, Wagenaar J, Brandjes DP, van Gorp EC. 2004. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23(6):425-33. Epub. 18.
- Manam, S.; Ledwith, B.J.; Barnum, A.B.; Troilo, P.J.; Pauley, C.J.; Harper, L.B.; Griffiths, T.G. 2nd; Niu, Z.; Denisova, L.; Follmer, T.T.; Pacchione, S.J.; Wang, Z.; Beare, C.M.; Bagdon, W.J.; Nichols, W.W. 2000. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 43, 273–281.
- Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. 1991. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis*; 164(2):294-301.

- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 564-81.
- Mathew A & Rothman AL. 2008. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 225:300-13.
- Meira, R. 1916. "Urucubaca" gripe ou dengue? *Dengue. Clínica médica.* São Paulo: Gráfica O Estado de S. Paulo. p.273-285.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RMP, Cuzzimaya T, Oliveira AV, Marchevsky RS, Mesquita RP, Schatzmayr HG. 1997. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin. Neuropathol.* 16: 204-208.
- Miller N. 2010. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12: 31-8.
- Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância em Saúde-SVS. Brasília, 2013. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>.
- Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância em Saúde-SVS. Brasília, 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_saude_2012_2015.
- Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. 2006. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 15;244(1-2):117-22. Epub 2006..
- Monath TP, Teuwen D, Cetron MS. Yellow fever. 2007. In Plotkin S, Orenstein WA, editors. *Vaccines.* 4ª Ed. Philadelphia: Saunders. P. 1-218.
- Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 29;91(7):2395-400.
- Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, Khemnu N, Tangthawornchaikul N, Chotiyarnwong P, Sae-Jang K, Koch M, Jones Y, McMichael A, Xu X, Malasit P, Screaton G. 2006. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 176(6):3821-9.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenichitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 9(7):921-7.
- Moore, A.C. & Hill, A.V. 2004, Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev;* 199:126-43.
- Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A *et al.* 2005. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine.* 23: 3469-76.

- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 3(1):13-22.
- Muller DA & Young PR. 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* May;98(2):192-208
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):14333-8.
- Murphy BR & Whitehead SS. 2011. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol.* 29:587-619.
- Nagesh K. Tripathi, Ambuj Shrivastava, Paban K. Dash and Asha M. Jana 2011. Detection of Dengue Virus Methods in Molecular Biology. 665, 51-64.
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, *et al.* 2011. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 5(11): e1397
- Navaro-Sanchez E, Depres P, Cedillo-Barrón L. Innate Immune Responses to Dengue Virus. *Archives of Medical Research.* 2005; 36: 425-435.
- Nielsen DG. 2009. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virol J.* 6:211.
- Nishioka K. 1974. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg. Immunol. (Leipz).*; 20–21: 385–392.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E et al. 1990. Isolation of dengue type 2 in Rio de Janeiro, *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 85: 253.
- Nogueira, R.M.R.; Miagostovich, M.P.; Filippis, A.M.B.; Pereira, M.A.S.; Schatzmayr, H.G. 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 96, n.7, p.925-926.
- Norman, J. A.; Hobart, P.; Manthirpe, M.; Felgner, P.; Wheeler, C. 1997. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine, Kidlington*, v.15, n.8, p.801- 803,.
- O'Hagan, D.T.; Singh, M.; Ulmer, J. B. 2006. Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods* 40, 10–19.
- Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, Alfon JA, et al. 2003. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol* 71(2) 259-64.
- Osanaí CH, Travassos Da Rosa AP, Tang AT, Do Amaral RS, Passos AD. 1983. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev. Inst. Med. Trop.* 25 (1): 53-54.

- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhao AT, Mota EM, Basilio-de-Oliveira CA, Schatzmayr OM, Alves AMB. 2009. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Laboratory investigation*. 89: 1140-1151.
- Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Takija CM, Farias Filho JC, Schatzmayr HG, Alves AMB, Barth OM. 2005. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*.; 338: 236-246.
- Pal, R.; Yu, Q.; Wang, S.; Kalyanaraman, V.S.; Nair, B.C.; Hudacik, L.; Whitney, S.; Keen, T.; Hung, C.L.; Hocker, L.; Kennedy, J.S.; Markham, P.; Lu, S. 2006. Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine*. 20;24(8):1225-34.
- Pan, Z.; Zhang, X.; Geng, S.; Cheng, N.; Sun, L.; Liu, B.; Huang, J.; Jiao, X. 2009. Priming with a DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and boosting with a killed vaccine confers protection of chickens against infection with the H9 subtype of avian influenza virus. *Vaccine*; 27:1018-23.
- Patey O, Ollivaud L, Breuil J, Lafaix C. 1993. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*; 48:793-802.
- Patterson, L.J. & Robert-Guroff, M. 2008. Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin Biol Ther*; 8:1347-63.
- Peek, L.J.; Middaugh, C.R.; Berkland, C. 2008. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:915-28. Ogura, M.; Paliwal, S.; Mitragotri, S. Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:1218-23.
- Perera R & Kuhn RJ. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.*; 11(4):369-77.
- Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. 1996. Immunization with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol*. 141: 743-749.
- Pierson TC & Diamond MS. 2008. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med.*; 10:e12.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, et al. 1998. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 143: 997-1003.

- Pryor, M. J. & Wright, P. J. 1993. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology*. v. 194, n. 2, p. 769-780.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. 1996. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis*. 174(6):1176-84.
- Putnak R, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Houg HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-Thanan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. 2005. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*. 23(35):4442-52.
- Putnak R. 1994. Progress in the development of recombinant vaccines against dengue and other arthropod-borne flaviviruses. In: *Modern vaccinology*. KURSTAK, E. (Ed.), New York: Plenum. Medical. 231-252.
- Qi, R., Zhang & L., Chi, C. W. 2008. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin*. v.40, n. 2, p. 91–101.
- Ramshaw IA, Fordham SA, Bernard CC, Maguire D, Cowden WB, Willenborg DO. 1997. DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol*. 75(4):409-13.
- Raviprakash K, Defang G, Burgess T, Porter K. 2009. Advances in dengue vaccine development. *Hum Vaccine*.; 5(8):520-8.
- Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, Phillips I, *et al*. 2000. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *J Gen Virol*. 81:1659-67.
- Raviprakash K, Wang D, Ewing D, Holman DH, Block K, Woraratanadharm J, Chen L, Hayes C, Dong JY, Porter K. 2008. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. *J Virol*. (14):6927-34.
- Reed LJ & Muench H 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493–497
- Reis, T.J. 1896. A febre dengue in Curitiba. *Gazeta Médica da Bahia*. v. 7, p. 163-266.
- Reyes-Sandoval, A. & Ertl, H.C. 2001. DNA vaccines. *Curr Mol Med*; 1:217-43
- Ribeiro AM, Souza AC, Amaral AC, Vasconcelos NM, Jeronimo MS, Carneiro FP, Faccioli LH, Felipe MS, Silva CL, Bocca AL. 2013.

- Nanobiotechnological approaches to delivery of DNA vaccine against fungal infection. *J Biomed Nanotechnol.* 9(2):221-30.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution *Science.* 229(4715):726-33.
- Rice CM. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: BN Fields, DM Knipe, PM. Howley (eds.) *Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 3rd edition., p. 931-959
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 230:244–251.
- Rico-Hesse. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 174:479–493.
- Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J.; Smit, J. M.; 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol. Life Science.* v.67, n.16, p.2773-2786.
- Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. 1997. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol.* 71(11): 8497-503.
- Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, *et al.* 2011. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 5(1): e935.
- Ross TM. 2010. Dengue virus. *Clin Lab Med.* 30(1):149-60.
- Rothman AL. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 113(7):946-51.
- Rothman, A. L. 2003. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res [S.I.]*, v. 60, p. 397-419.
- Sabchareon A, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Margolis HS, Letson GW. 2012a. Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. I. Epidemiology of symptomatic acute dengue infection in children, 2006-2009. *PLoS Negl Trop Dis.*6(7).
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 2012b. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.*

- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 2012a. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. Nov 3;380 (9853):1559-67. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61428-7
- Sánchez IJ & Ruiz BH. 1996. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*. 77 (Pt 10):2541-5.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*. Nov;120(5):653-69
- Santos HA. 2012. Porous-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery applications. *Biomatter*. 2(4):237-8. doi: 10.4161/biom.23024.
- Santos NQ, Azoubel AC, Lopes AA, Costa G, Bacellar A. 2004. Guillain-Barré syndrome in the course of dengue: case report. *Arq Neuropsiquiatr*. 62(1):144-6.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 81: 245-246.
- Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W., Walsh, E. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol*. v. 68, p. 853-857.
- Schlesinger, J. J.; Foltzer, M.; Chapman, S. 1993. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology*. v. 192, n. 1, p. 132-141.
- Secretaria de Defesa Civil do Rio de Janeiro (SESDEC-RJ). 2008. Ações em Saúde. Dengue. Relatório de casos de dengue. Rio de Janeiro. <http://www.rj.gov.br/web/ses/exibeconteudo?article-id=1604662>
- Shiao MF, Chang FY, Hou SC. 1992. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 86: 672–675.
- Shedlock DJ & Weiner DB. 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol*. 68(6):793-806.
- Sheets, R.L.; Stein, J.; Manetz, T.S.; Duffy, C.; Nason, M.; Andrews, C.; Kong, W.P.; Nabel, G.J.; Gomez, P.L. 2006 Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol. Sci*. Jun; 91(2), 610–619.

- Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P. R. and Harris, E. 2004. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J. Virol.* 78:2701.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2004. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* ;42(6):2489-94.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2000. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 62(2):224-32.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(4):622-30.
- Shu, P.; Cheng-Fen, Y.; Kao, J.; Su, C.; Chang, S.; Lin, C.; Yang, W.; Shih, H.; Yang, S.; Wu, P.; Wu, H.; Huang, J. 2009. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at Airports. *Clinical and vaccine immunology.* v. 16, n. 4, p. 589–591.
- Simmons M, Burgess T, Lynch J, Putnak R. 2010. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology.* 396(2):280-8.
- Simmons M, Porter KR, Hayes CG, Vaughn DW, Putnak R. 2006. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *J Virol.*; 80(19):9577-85.
- Simmons, C. P.; Farrar, J. J.; Chau, N. V.; Wills, B. 2012. Review Article Dengue. *Engl. J. Med.*, v.366, p. 1423-1432.
- Smith GW & Wright PJ. 1985. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol.* 66:559-71.
- Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, de Freitas MR, Zalis M, et al. 2011. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci.* 303: 75–9.
- Souza LJ, Coelho JM, Silva EJ, Abukater M, Almeida FC, Fonte AS, Souza LA. 2008. Acute hepatitis due to dengue virus in a chronic hepatitis patient. *Braz J Infect Dis.* 12(5):456-9.

- Souza LJ, Reis AF, de Almeida FC, Souza LA, Abukater M, Gomes MA, Abicair OA, Gonçalves PA. 2008b. Alteration in the erythrocyte sedimentation rate in dengue patients: analysis of 1,398 cases. *Braz J Infect Dis.* 12(6):472-5.
- Stephenson JR. 2005 Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ.* 83(4): 308-314.
- Stiasny K, Heinz FX. 2006. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* 87(10): 2755-2766.
- Stiasny, K. & Heinz, F. X. 2012. Flaviviruses and flavivirus. *Vaccines.* v.30, n.29, p.4301 – 4306.
- Strugnell RA, Drew D, Mercieca J, DiNatale S, Firez N, Dunstan SJ, Simmons CP, Vadolas J. 1997. DNA vaccines for bacterial infections. *Immunol Cell Biol.* Aug;75(4):364-9.
- Suksapaisan, L.; Susantad, T.; Smith, D. R. 2009. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *Journal of Biomedical Science.*, v. 4, p. 16-17.
- Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. 2007. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* :2291-9.
- Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. 1998. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol.* 36(5):1189-92.
- Tan GK & Alonso S. 2009. Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Curr Opin Infect Dis.* 22(3):302-8.
- Tang, D.C.; DeVit, M.; Johnston, S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152–154.
- Temin, H.M. 1990. Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J. Med. Virol.* 31, 13–17.
- Thomas SJ & Endy TP. 2011. Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis.* (5):442-50.
- Timofeev AV, Butenko VM, Stephenson JR. 2004. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. *Virus Genes.* 28(1):85-97.
- Tokuoka, M.; Tanaka, M.; Ono, K.; Takagi, S.; Shintani, T.; Gomi, K. 2008 Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl Environ Microbiol*; 74:6538-46.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A. 1993

- Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* Mar 19;259 (5102), 1745–1749.
- Ulmer, J.B.; Wahren, B.; Liu, M.A. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12, 216–222.
- Umareddy I., Pluquet O., Wang Q.Y., Subhash G Vasudevan S.G., Chevet E., Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal*, 4:91
- Valdés K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodríguez R, Guzmán MG. Human 2000. Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(5):856-7.
- Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, et al. 2009. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology* 394: 249–58.
- van Der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. 2000. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantification of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J. Virol.* 74: 8094-101.
- van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R. 2003. Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol.* 15: 119-25.
- Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, Green S, Libraty DH, Ennis FA, Rothman AL, Stephens HA. 2009. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis.*; 199(10):1442-8.
- Villarreal DO, Talbott KT, Choo DK, Shedlock DJ, Weiner DB. 2013. Synthetic DNA vaccine strategies against persistent viral infections. *Expert Rev Vaccines.* 12(5):537-54. doi: 10.1586/erv.13.33
- Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. 2013. Autoimmunity in dengue pathogenesis *Formos Med Assoc.* 112(1):3-11.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., Weaver, S. C. 2000. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology.*, 74 (7), 3227-3234.
- Wang, Q.M.; Sun, S.H.; Hu, Z.L.; Yin, M.; Xiao, C.J.; Zhang, J.C. 2004 Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* 22, 3622–3627.
- Watabe, S.; Xin, K-Q.; Ihata, A.; Liu, L-J.; Honsho, A.; Aoki, I.; Hamajima, K.; Wahren, B.; Okuda, K. 2001. Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine*; 19:4434-44.

- Were, F.. 2012. The dengue situation in Africa. *Paediatrics and International Child Health*. v. 32, p 18-21.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. 2003. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res*. 59:99-140. Review.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol*. Sep;71 (9):6650-61.
- Whitehead, S. S.; Blaney, J. E.; Durbin, A. P.; Murphy, B. R. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, n. 7, p. 518-528.
- Whitehorn J & Simmons CP. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*;29:7221-8.
- WHO.1997. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2009. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, new edition. Geneva World Health Organization.
- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. 2000. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol*. 164(9): 4635-4640.
- Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. 1989. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*. 171(1): 302-305
- Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465–1468.
- Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF, Sytwu HK. 2003. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*.; 21(25-26):3919-29.
- Xu, J.; Ding, Y.; Yang, Y. 2008 Enhancement of mucosal and cellular immune response in mice by vaccination with respiratory syncytial virus DNA encapsulated with transfersome. *Viral Immunol*; 21:483-9.
- Yauch LE & Shresta S. 2008. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Research.*, 80: 87-93.

- Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. 2009. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 182(8):4865-73.
- Young, P. R.; Hilditch, P. A.; Blechly, C., Halloran, W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, n. 3, p.1053-1057.
- Zaharoff, D.A.; Barr, R.C.; Li, C.Y.; Yuan, F. 2002. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.*; 9:1286-90. 155, n. 2, p. 157–160.
- Zainah S, Wahab AH, Mariam M, Fauziah MK, Khairul AH, Roslina I, Sairulakhma A, Kadimon SS, Jais MS, Chua KB. 2009. Performance of commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengueNS1 antigen-capture ELISA. *J Virol Methods.* 155(2):157-60.