

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Resposta imune anti-dengue em um modelo murino:
avaliação da resposta imune primária na infecção e da
resposta imune induzida por vacinas de DNA**

Edson Roberto Alves de Oliveira

Rio de Janeiro

2014

i

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Resposta imune anti-dengue em um modelo murino: avaliação da resposta imune primária na infecção e da resposta imune induzida por vacinas de DNA

Edson Roberto Alves de Oliveira

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e molecular

Orientadoras: Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Tese intitulada: **Resposta imune anti-dengue em um modelo murino: avaliação da resposta imune primária na infecção e da resposta imune induzida por vacinas de DNA**

Edson Roberto Alves de Oliveira

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Wilson Savino (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ)

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ) (**Revisora**)

Dra. Silvia Beatriz Boscardin (Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP)

Suplentes:

Dra. Juliana de Meis (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ)

Dra. Adriana Lima Vallochi (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ)

Rio de Janeiro

2014

iii

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Edson Roberto Alves de

Resposta imune anti-dengue em um modelo murino: avaliação da resposta imune primária na infecção e da resposta imune induzida por vacinas de DNA / Edson Roberto Alves de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2014.

xviii, 213 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 156-181

1. Dengue. 2. Resposta imune. 3. Modelo murino. 4. Vacina de DNA. 5. Proteína NS1. I. Título.

CDD 616.91852

Ao Sr. José e a Sra. Josefa, com
muito respeito, carinho e em débito
sempre.

A natureza reservou para si tanta liberdade que é impossível penetrá-la completamente com nosso saber e a nossa ciência.

Goethe

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, às minhas orientadoras, Dra. Ada Alves e Dra. Ana Cristina (Tininha), pelo crédito de confiança ao estabelecer comigo este longo relacionamento orientador-aluno. Muito obrigado a vocês por toda dedicação no meu aprendizado durante este trabalho e por me trilhar na vida profissional. Agradeço também, à minha segunda família, todos do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV), local onde a integração e a interação entre pesquisadores e estudantes me fez amadurecer no âmbito científico.

Agradeço à valiosa ajuda do Dr. Antônio Gonçalves nos experimentos com animais, bem como o esforço dos outros membros do grupo que participaram ativamente na evolução deste trabalho. Muito obrigado ao Márcio Mantuano pela assistência nos experimentos envolvendo citometria de fluxo, à Dra. Simone Costa pelo grande auxílio, especialmente na parte de biologia molecular. Da mesma forma, agradeço à Dra. Adriana Azevedo, Dr. Marciano Paes, à Juliana, ao Eduardo, à Kissila, ao Rafael, à Paolla, à Giulia, às Natálias, e aos amigos que atualmente não compõem a equipe, como a Ana Paula, Manu, Tamires e Tiago. Enfim, sou muito grato a todos que tornaram possível a realização dos experimentos neste trabalho, que não somente muitas cabeças, mas também muitos braços foram necessários.

Agradeço ao apoio do laboratório de pesquisas sobre Timo (LTP), em especial ao Dr. Savino pela permissão para uso do aparelho de FACS, à Dra. Juliana De Meis pela colaboração, ao Luiz e à Juliana (aluna da Dra. De Meis), os quais também foram sempre solícitos aos meus pedidos de “socorro experimental”.

Dedico agradecimentos ao pessoal da plataforma de citometria, como o Alessandro, a Dani e a Cinthia, os quais sempre trabalharam com muita dedicação e preocupação nas nossas leituras experimentais. Faço agradecimentos também ao pessoal do laboratório da Dra. Myrna Bonaldo pelo uso de equipamentos, ao pessoal do laboratório da Dra. Claire Kubelka, como a Dra. Amanda Torrentes e a Dra. Mariana Gandini pelo importante auxílio nos experimentos, e em especial à Dra. Luzia Oliveira pelo trabalho de revisão deste manuscrito. Muito obrigado, também, à Dra. Paula de

Luca pelo empréstimo do *software* FloJo e à Dra. Cecília de Almeida pelo auxílio nos experimentos.

Não poderia deixar de agradecer às pessoas do meu convívio que me incentivaram e me apoiaram a todo tempo, como meus queridos pais, Sr. José e Sra. Josefa, meu irmão Sérgio e meu grande amigo Gustavo.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês: <i>antibdy dependent enhancement</i>)
AG129	camundongos deficientes de receptores para IFNs do tipo 1 e 2
ALT	alanina aminotransferase
AmpR	gene de resistência à ampicilina
APC	aloficocianina (fluoróforo conjugado à anticorpos de detecção) ou célula apresentadora de antígeno (do inglês: <i>antigen-presenting cell</i>)
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
B220 ^{hi} _{ag}	população celular com morfologia de maior granulosidade e com alta expressão de B220 na sua superfície
B220 ^{hi} _{bg}	população celular com morfologia de menor granulosidade e com alta expressão de B220 na sua superfície
B220 ^{low} _{ag}	população celular com morfologia de maior granulosidade e com baixa expressão de B220 na sua superfície
B220 ^{low} _{bg}	população celular com morfologia de menor granulosidade e com baixa expressão de B220 na sua superfície
BHG polyA	cauda de poliadenilação derivada do hormônio de crescimento bovino
BSA	albumina do soro bovino (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)
C6/36	linhagem de células de mosquito
CBA	ensaio multiplex de detecção de citocinas assistida por citometria de fluxo (do inglês: <i>cytometric bead array</i>)
CD	grupamento de diferenciação (do inglês: <i>cluster of differentiation</i>)
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CMVpro	promotor de citomegalovírus
ColE1 ori	origem de replicação em célula bacteriana
CTL	linfócito T citotóxico (do inglês: <i>cytolytic T- lymphocyte</i>)
Cy7	cianina
CYD-TDV	do inglês: <i>chimeric yellow-fever/dengue - tetravalent dengue vaccine</i>
d.a.i.	dias após a infecção
D2S10	cepa viral do DENV2 isolada de paciente (PL046) adaptada entre camundongos e células de mosquito
DENV	vírus da dengue
LD ₅₀	dose viral que acarreta na morte de 50% dos animais testados
ELISA	do inglês: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	do inglês: <i>Fluorescence Assisted Cell Sorter</i>
FD	febre do dengue

FHD	febre hemorrágica do dengue
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FRhL	do inglês: <i>fetal rhesus lung</i>
FSC	dispersão frontal de luz (do inglês: <i>forward light scatter</i>)
GSK	GlaxoSmithKline
HepG2	linhagem celular humana de hepatocarcinoma
HuH7	linhagem celular humana de hepatocarcinoma
i.c.	intra-cerebral
i.m.	intra-muscular
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venoso
IFN	interferon
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
kb	kilobase
LB	Meio de cultura <i>Luria-Bertani</i>
LN	linfonodo
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1
MFI	mediana da intensidade de fluorescência
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: <i>main histocompatibility complex</i>)
<i>Mock</i>	controle de infecção viral onde se utiliza apenas o veículo
NGC	cepa Nova-Guiné
NK	do inglês: natural killer
NS	não estrutural
NTP	nucleosídeo trifosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	fase aberta de leitura (do inglês: <i>open reading frame</i>)
PBS	tampão fosfato salino (do inglês: <i>phosphate saline buffer</i>)
pcDNA3	plasmídeo comercial utilizado para o desenvolvimento dos plasmídeos vacinais pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2
pcTPA	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
pcTPANS1	plasmídeo recombinante que contém o gene da proteína NS1 de DENV2 fusionado à sequência t-PA
pcTPANS3	plasmídeo recombinante que contém o gene da proteína NS3 de DENV2 fusionado à sequência t-PA
PDK	do inglês: <i>primary dog kidney</i>

PE	ficoeritrina
pE1D2	plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV2 fusionado à sequência t-PA
PerCP	clorofila peridinina
PL046	cepa viral de dengue-2 isolada de paciente
proteína C	proteína do capsídeo
proteína E	proteína do envelope
proteína M	proteína de membrana
proteína prM	proteína precursora da proteína M
RAG	gene ativador de recombinação (do inglês: <i>recombination activating gene</i>)
rDEN1Δ30	DENV-1 contendo uma deleção de 30 nucleotídeos na região 3'-UTR
rDEN2/4Δ30	rDEN4Δ30 contendo os genes prM/E substituídos pelos de DENV-2
rDEN3/4Δ30	rDEN4Δ30 contendo os genes prM/E substituídos pelos de DENV-3
rDEN4Δ30	DENV-4 contendo uma deleção de 30 nucleotídeos na região 3'-UTR
RdRp	RNA polimease dependente de RNA (do inglês: <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RE	retículo endoplasmático
RPMI	meio de cultura celular desenvolvido pelo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCID	imunodeficiência combinada grave (do inglês: <i>severe combined immunodeficiency</i>)
SNC	sistema nervoso central
SPF	livre de patógenos específicos (do inglês: <i>specific pathogen free</i>)
<i>Spike</i>	controle amostral que contém quantidade conhecida de um analito o qual pretende ser detectado por uma determinada técnica
SSC	dispersão lateral de luz (do inglês: <i>side light scatter</i>)
SSD	síndrome do choque do dengue
TAE	tris-acetato etileno diaminotetracético
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TLR	receptores semelhantes a toll (do inglês: <i>toll-like receptors</i>)
TNF	fator de necrose tumoral (do inglês: <i>tumor necrosis factor</i>)
t-PA	sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano
UTR	região não traduzida (do inglês: <i>untranslated region</i>)
YFV-17D	cepa vacinal 17D da febre amarela

RESUMO

A dengue é considerada uma grande ameaça em um vasto território mundial que resulta em cerca de 20 mil mortes ao ano. Modelos animais para o estudo da dengue constituem uma ferramenta importante não somente para o desenvolvimento de estratégias anti-dengue como vacinas e antivirais, mas também para o estudo da resposta imune induzida após a infecção. Uma abordagem amplamente utilizada para testes de candidatos vacinais é o uso de camundongos BALB/c infectados por via intracerebral (i.c.) com um vírus DENV neuroadaptado. Como este modelo envolve um desafio letal, inúmeros trabalhos fizeram uso apenas deste parâmetro para avaliar a eficácia de vacinas anti-dengue. Sendo assim, pouco se sabe a respeito da dinâmica da resposta imune primária em animais infectados pela via intracerebral, bem como os mecanismos pelos quais uma vacina pode exercer proteção contra a infecção sob tais condições. Neste contexto, o presente estudo objetivou analisar a resposta imune anti-dengue no modelo BALB/c infectado por via i.c. com o vírus DENV neuroadaptado, investigando a participação de subpopulações celulares na imunidade primária e também durante a imunidade adaptativa induzida por vacinas de DNA. Com relação à resposta imune primária, observamos que apesar da via de inoculação não natural empregada, foi possível observar efeitos periféricos decorrentes da infecção com DENV2, como ativação e migração de células T para órgãos alvo, bem como produção de anticorpos e citocinas. Com relação à resposta imune adaptativa aos antígenos do DENV, detectamos que vacinas de DNA que codificam as proteínas NS1, NS3 ou E de DENV2 produzem efeitos peculiares quanto à ativação de células T. Vimos que os antígenos E e NS3, principalmente NS3, induzem ativação de células T mais acentuada do que o antígeno NS1, segundo a expressão reduzida de CD45RB na superfície destas células. Experimentos de transferência de células T utilizando CFSE como sonda mostraram que após o desafio com DENV, animais protegidos pela vacinação com pcTPANS1 apresentaram ativação marcante de células T com proliferação e migração destas células para diversos locais no hospedeiro, incluindo tecido hepático e cerebral. Durante a resposta imune adaptativa ao antígeno NS1, foram encontrados alguns possíveis correlatos de proteção, como por exemplo, os fenótipos $TCD4^+CD44^{hi}$ e $TCD8^+CD44^{hi}CD69^-$ presentes no baço. Além disso, uma população celular de alta granulosidade $B220^{hi}CD19^+CD11c^{low}$ presente no sangue de camundongos BALB/c após o desafio com DENV parece estar relacionada a uma melhor condição clínica destes animais. Em conclusão, este estudo contribuiu para a compreensão da dinâmica da resposta imune em animais infectados pela via i.c. Além disso, o estudo forneceu novos *insights* na compreensão dos mecanismos envolvidos na proteção induzida por vacinas de DNA anti-dengue.

ABSTRACT

Dengue is considered a major threat worldwide that results in approximately 20000 deaths every year. Animal models for dengue disease represent an important tool not only to develop anti-dengue strategies, such as vaccines and antivirals, but also to investigate the immune response induced during the infection. A commonly used approach to evaluate vaccine candidates is the BALB/c mouse model infected with a neuroadapted DENV by the intracerebral (i.c.) route. Since the animals succumb to the infection in this model, many groups consider only the survival as the endpoint in the evaluation of anti-dengue vaccine efficacy. Therefore, little is known about the primary immune response dynamics of these animals infected by the i.c. route, as well as the mechanisms through which the vaccine may protect the host under such conditions. In this context, the present study aimed to analyse the primary immune response against DENV in the BALB/c mouse model, investigating the role of cellular subpopulations in the primary immunity and also during the adaptive immunity induced by DNA vaccines. Concerning the primary immune response, even though the inoculation route applied was not natural, peripheral effects caused by DENV infection, like T cell activation and migration to target organs, as well as the production of antibodies and cytokines were observed. With respect to the adaptive immune response to DENV antigens, DNA vaccines that encode the NS1, NS3 or E DENV proteins produced peculiar effects once considering the activation of T cells. We found that E and NS3 antigens, mainly NS3, induced more pronounced T cell activation in comparison to NS1 protein, as measured by the surface membrane expression of CD45RB. Transference experiments of T cells obtained from vaccinated animals and traced by CFSE showed evident T lymphocytes activation, proliferation and migration to different sites in the host, including hepatic and brain tissue, after DENV challenge. During the adaptive immune response to NS1 antigen we found possible cell-phenotypes related to protection, such as $\text{TCD4}^+\text{CD44}^{\text{hi}}$ and $\text{TCD8}^+\text{CD44}^{\text{hi}}\text{CD69}^-$ detected in the spleen. Besides, a cell population $\text{B220}^{\text{hi}}\text{CD19}^+\text{CD11c}^{\text{low}}$, showing high granularity, detected in blood samples after DENV challenge seemed also to be related with a better clinical condition of these animals. In conclusion, this study contributed for the elucidation of the immune response dynamics in animals infected with DENV by the i.c. route. Moreover, this work provided new insights in the comprehension of the mechanisms involved in the protection induced by anti-dengue DNA vaccines.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Consenso de evidência da dengue no mundo.	2
Figura 1.2. Incidência e número de casos no Brasil durante o período de 2000 a 2010.	4
Figura 1.3. Estrutura e genoma do DENV.	8
Figura 1.4. Ciclo de replicação do DENV.	10
Figura 1.5. Representação esquemática do mecanismo de ADE.	17
Figura 3.1: Representação esquemática das sequências contidas nos diferentes plasmídeos vacinais.	35
Figura 3.2. Curvas de calibração para a determinação de citocinas.	44
Figura 3.3. Representação do procedimento de enriquecimento de células T e marcação com CFSE e transferência de células para camundongos BALB/c desafiados com DENV.	48
Figura 4.1 Susceptibilidade de animais BALB/c à infecção primária com DENV2 por via intracerebral.	52
Figura 4.2. Estratégia de análise da ativação de células T na infecção primária por DENV segundo expressão de CD45RB.	54
Figura 4.3. Ativação de células T na infecção primária por DENV segundo expressão de CD45RB.	56
Figura 4.4. Resposta de células T efectoras no fígado de animais infectados com DENV.	58
Figura 4.5. Infiltrado linfocitário cerebral após infecção com DENV.	61
Figura 4.6. Resposta humoral na infecção primária por DENV em camundongos BALB/c.	63
Figura 4.7. Ativação de linfócitos B na infecção primária por DENV.	65
Figura 4.8. Determinação de citocinas relacionadas à inflamação no plasma de camundongos BALB/c infectados com DENV2 por via i.c.	67
Figura 4.9. Representação esquemática dos plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 e avaliação de integridade em gel de eletroforese.	71
Figura 4.10. Sobrevivência e morbidade de camundongos imunizados com vacinas de DNA contendo os genes NS1, NS3 ou E e desafiados com DENV2.	73
Figura 4.11. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pcTPANS1.	75
Figura 4.12. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pcTPANS3.	78

Figura 4.13. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pE1D2.....	81
Figura 4.14. Análise dos níveis de citocinas em animais imunizados com vacinas de DNA que codificam NS1, NS3 ou o ectodomínio da proteína E de DENV2.....	84
Figura 4.15. Estratégia de análise de ativação de células T baseada na expressão de CD44 e CD69..	89
Figura 4.16. Ativação de células T esplênicas em camundongos BALB/c, previamente imunizados com pcTPANS1, na infecção com DENV2.....	92
Figura 4.17. Ativação de células T sanguíneas em camundongos BALB/c, previamente imunizados com pcTPANS1, na infecção com DENV.....	95
Figura 4.18. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no baço de animais imunizados ou não com pcTPANS1.	98
Figura 4.19. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no sangue de animais imunizados ou não com pcTPANS1.	100
Figura 4.20. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no fígado de animais imunizados ou não com pcTPANS1.....	103
Figura 4.21. Infiltrado celular isolado a partir do cérebro de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 após o desafio com DENV2.....	105
Figura 4.22. Estratégia de análise citométrica para infiltrados linfocitários cerebrais provenientes de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1.....	107
Figura 4.23. Fenotipagem de células T presentes no cérebro de animais imunizados ou não com pcTPANS1.....	109
Figura 4.24. Avaliação das amostras marcadas com CFSE utilizadas na transferência de células.	111
.....	111
Figura 4.25. Ensaio de migração e proliferação linfocitária em decorrência do estímulo com pcTPANS1 frente ao desafio com DENV.	115
Figura 4.26. Perfil de citocinas circulantes em camundongos imunizados ou não com pcTPANS1 após desafio com DENV.....	118
Figura 4.27. Participação da resposta humoral em camundongos BALB/c na imunidade adaptativa induzida pelo antígeno NS1.	121
Figura 4.28. Características morfológicas da população B220hi caracterizada no sangue de camundongos BALB/c.....	124

Figura 4.29. Relação entre células B220hi presentes no sangue e a morbidade induzida em camundongos BALB/c após desafio com DENV.....	126
Figura 4.30. Pesquisa de células B220hi em longo prazo após o desafio com DENV em animais vacinados com pcTPANS1.....	128
Figura 4.31. Perfis fenotípicos das populações B220+ quanto à expressão de CD19, CD11c e CD49b em animais vacinados e analisados 21 dias após infecção com DENV.....	130
Figura 4.32. Avaliação simultânea de expressão de CD19 e CD49b em subpopulações B220+....	133
Figura 5.1. Resumo esquemático da hipótese da dinâmica da resposta imune detectada no modelo de infecção por via i.c.....	142
Figura 5.2. Resumo esquemático da hipótese de proteção mediante a imunização com a vacina de DNA pcTPANS1 frente à infecção por DENV.	152

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS.	6
Tabela 1.2. Protótipos vacinais tetravalentes contra a dengue.	24
Tabela 3.1. Relação dos anticorpos empregados nos ensaios de imunofenotipagem	41
Tabela 4.1. Resumo das alterações da resposta imune na infecção primária com DENV2 por via i.c.	69
Tabela 4.2. Resumo das alterações da resposta imune induzida pelas vacinas de DNA	87
Tabela 4.3. Expressão de CD19 e CD49b na superfície de subpopulações B220⁺	133
Tabela 4.4. Resumo das alterações da resposta imune após vacinação com pcTPANS1 e desafio com DENV2	135

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE	20
1.2. IMPLICAÇÕES CLÍNICAS NA DENGUE	24
1.3. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO REPLICATIVO	26
1.4. PROTEÍNAS VIRAIS	30
1.5. RESPOSTA IMUNE	32
1.6. VACINAS CONTRA A DENGUE.....	38
1.6.1. <i>Vacinas de DNA</i>	44
1.7. MODELOS EM CAMUNDONGOS PARA O ESTUDO DA DENGUE	46
1.7.1. <i>Infecção intra-cerebral com vírus neuroadaptado</i>	47
1.7.2. <i>Camundongos quiméricos humanizados</i>	47
1.7.3. <i>Camundongos imunodeficientes</i>	49
1.8. MODELOS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PARA O ESTUDO DA DENGUE	50
2. OBJETIVOS	51
2.1. OBJETIVO GERAL	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. VACINAS DE DNA EMPREGADAS NO ESTUDO	53
3.2. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS VACINAS DE DNA	54
3.3. QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES PLASMIDIAIS	55
3.4. IMUNIZAÇÃO E DESAFIO	55
3.5. AVALIAÇÃO DE MORBIDADE APÓS DESAFIO COM DENV	56
3.6. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE CITOMÉTRICA	56
3.6.1. <i>Sangue</i>	56
3.6.2. <i>Baço</i>	57
3.6.3. <i>Linfonodo</i>	57
3.6.4. <i>Fígado</i>	58
3.6.5. <i>Cérebro</i>	58
3.6.6. <i>Medula óssea</i>	59
3.7. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	59
3.8. ENSAIO DE ELISA	61
3.9. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS	61
3.10. ENRIQUECIMENTO DE CÉLULAS T E MARCAÇÃO COM CFSE PARA ENSAIOS DE TRANSFERÊNCIA	65
3.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	68
4. RESULTADOS.....	69
4.1. RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA APÓS INOCULAÇÃO DE DENV POR VIA INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS BALB/C	69
4.1.1 <i>Heterogeneidade da morbidade no modelo de infecção com DENV2</i>	69
4.1.2 <i>Células T esplênicas e sanguíneas participam na resposta ao DENV inoculado por via intracerebral</i>	72

4.1.3	<i>Resposta de células T efetoras no tecido hepático dos animais infectados com DENV</i>	76
4.1.4	<i>Animais infectados exibindo comprometimento do SNC apresentam infiltrado cerebral linfocitário com predominância de células CD4⁺</i>	79
4.1.5	<i>Resposta primária de células B no modelo de infecção com DENV</i>	81
4.1.6	<i>Citocinas relacionadas à inflamação presentes no sangue de animais BALB/c infectados com DENV</i>	85
4.1.7	<i>Resumo da resposta imune primária induzida contra o DENV</i>	87
4.2	VACINAS DE DNA QUE CODIFICAM OS ANTÍGENOS NS1, NS3 OU E DO VÍRUS DENV2	89
4.2.1	<i>Avaliação da integridade dos plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2</i>	89
4.2.2	<i>Proteção contra desafio letal com DENV2 induzida após imunização com pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2</i>	91
4.2.3	<i>Antígenos virais NS1, NS3 e E do vírus DENV e a imunidade celular</i>	93
4.2.4	<i>Determinação dos níveis de citocinas no plasma de animais imunizados com pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2</i>	102
4.2.5	<i>Resumo da resposta imune induzida com as vacinas de DNA contra DENV</i>	105
4.3	RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA PROMOVIDA PELO ANTÍGENO NS1 DE DENV2 EXPRESSO A PARTIR DO PLASMÍDEO PCTPANS1	107
4.3.1	<i>Cinética de ativação de células T em resposta à introdução do DENV em animais imunizados com pcTPANS1</i>	107
4.3.2	<i>Correlação entre morbidade induzida por DENV e subpopulações de células T em camundongos BALB/c previamente imunizados com pcTPANS1</i>	115
4.3.3	<i>Migração e proliferação linfocitária induzida na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1</i>	129
4.3.4	<i>Perfil de citocinas induzido na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1</i>	136
4.3.5	<i>Investigação da vertente humoral na imunidade adaptativa ao antígeno NS1 induzida pela vacina pcTPANS1</i>	138
4.3.6	<i>Resposta imune adaptativa protetora anti-dengue envolve expressão diferenciada de B220 em células do sangue</i>	142
4.3.7	<i>Células B220^{hi} permanecem no sangue de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 após a infecção e constituem uma população heterogênea segundo expressão de CD19 e CD49b</i>	146
4.3.8	<i>Resumo da resposta imune induzida com o pcTPANS1 frente ao desafio com DENV</i>	153
5.	DISCUSSÃO	156
6.	CONCLUSÕES	172
7.	PERSPECTIVAS	174
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
	ANEXO I - Cooperation between CD4⁺ T cells and humoral immunity is critical for protection against dengue using a DNA vaccine based on the NS1 antigen - PLOS Neglected Tropical Diseases (submetido à publicação)	182

1. Introdução

O vírus da dengue (DENV) é o agente etiológico causador da arbovirose mais impactante na saúde pública geral. O patógeno é constituído de quatro sorotipos distintos (DENV1-4), que são genética e antigenicamente relacionados (Guzmán e Kouri, 2002). Notícias recentes relataram a suspeita da existência de um quinto sorotipo viral (Normile, 2013), entretanto, registros científicos ainda não estão disponibilizados a respeito deste novo achado. Todos os quatro sorotipos causam manifestações clínicas equivalentes e exibem padrões similares de disseminação sistêmica, com tropismo principalmente pelos monócitos, macrófagos e pelas células dendríticas (Jessie et al., 2004; Durbin et al., 2008).

A dengue é uma doença cosmopolita que atinge principalmente os países contidos na zona tropical e sub-tropical do planeta. Devido ao número alarmante de casos, óbitos e ao difícil controle de alastramento da doença, ela é vista com muita preocupação pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013). Infelizmente, ainda não existe uma terapia antiviral específica e eficaz contra a dengue, ou uma vacina anti-dengue disponível no mercado. Atualmente, a tentativa do controle da doença é exercida por meio de programas educacionais, controle do vetor e através do tratamento dos sintomas. Novas abordagens de desenvolvimento vacinal estão sendo consideradas, uma vez que o protótipo tetravalente vacinal mais adiantado nos ensaios clínicos mostrou ser pouco eficaz (Halstead, 2012; Sabchareon et al., 2012).

1.1. Epidemiologia da dengue

A distribuição dos mosquitos *Aedes spp.* explica a alta taxa de transmissão desta doença que ocorre principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical do planeta, onde se alberga mais da metade da população humana residente em mais de 100 países (Figura 1.1) (WHO, 2013). Um fator epidemiológico agravante na ocorrência das infecções é o fato do clima tropical ser um grande atrativo de turistas oriundos de países desenvolvidos de clima temperado, o que gera um constante risco de

espalhamento da doença para regiões não endêmicas e caracterizando-a como uma doença cosmopolita (La Ruche et al., 2010; CDC, 2010).

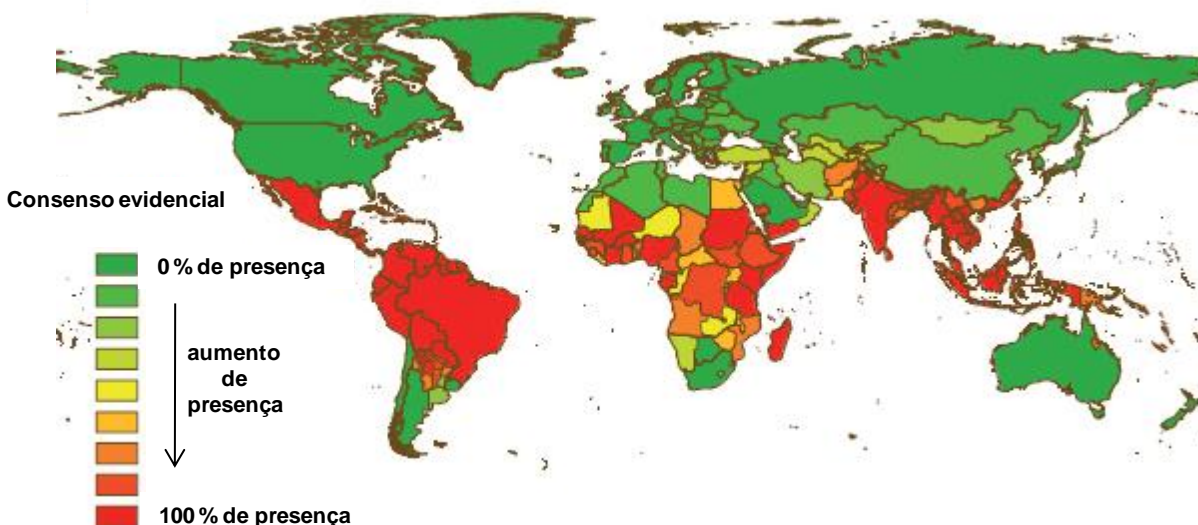


Figura 1.1. Consenso de evidência da dengue no mundo. Representação mundial apresentando os países afetados pela dengue. Os níveis presenciais da doença foram colocados em uma escala cromática do verde ao vermelho, variando de 0 a 100 %. Modificado de Bhatt et al, 2013.

A dengue foi praticamente erradicada no ambiente urbano até a década de 1950, entretanto, passou a ser reintroduzida nas cidades em virtude do deslocamento de tropas durante a Segunda Guerra Mundial, que acarretou no seu espalhamento na Ásia (Gubler, 2006). Nas Américas, o vetor *Aedes aegypti* foi erradicado no período de 1950 a 1960 em virtude de um programa da Organização Panamericana de Saúde para controlar o vírus da febre amarela, que também é transmitido pelos mesmos vetores da dengue. Este programa deixou de existir na década de 70, o que levou a reinfestação do vetor e reintrodução do DENV nos anos subsequentes (Halstead, 2006).

Hoje, a dengue representa a principal virose reemergente apresentando incidência progressiva nos últimos 50 anos, com aumento significativo no número de casos graves (WHO, 2013). Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente, das quais 96 milhões manifestam a doença clinicamente. As formas

graves da doença são responsáveis por aproximadamente 20 mil mortes ao ano em escala mundial (Reiter, 2010; Bhatt et al, 2013). Economicamente, cada caso de dengue nas Américas movimenta gastos que variam entre US\$ 362 a US\$ 752, incluindo os custos diretos e indiretos (Stahl et al., 2013).

No território brasileiro durante o período de 2000 a 2010, a incidência da dengue variou substancialmente atingindo pico em 2010, com mais de um milhão de casos, principalmente na região centro-oeste. No ano de 2004 ocorreu a menor incidência, com aproximadamente 72 mil casos (Figura 1.2). O acréscimo do número de casos reportados da doença ao longo da última década foi significativo e remete a progressão do problema de saúde na escala temporal, mesmo que sabidamente subnotificada (Teixeira et al., 2013). A circulação dos quatro sorotipos ao longo dos anos contribuiu para uma mudança do panorama atual da dengue. Crianças e adolescentes com faixa etária de até 15 anos passaram a ser mais gravemente acometidos por dengue a partir de 2007, ao invés da doença se estabelecer principalmente nos adultos entre 20 e 40 anos como ocorria nos 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).

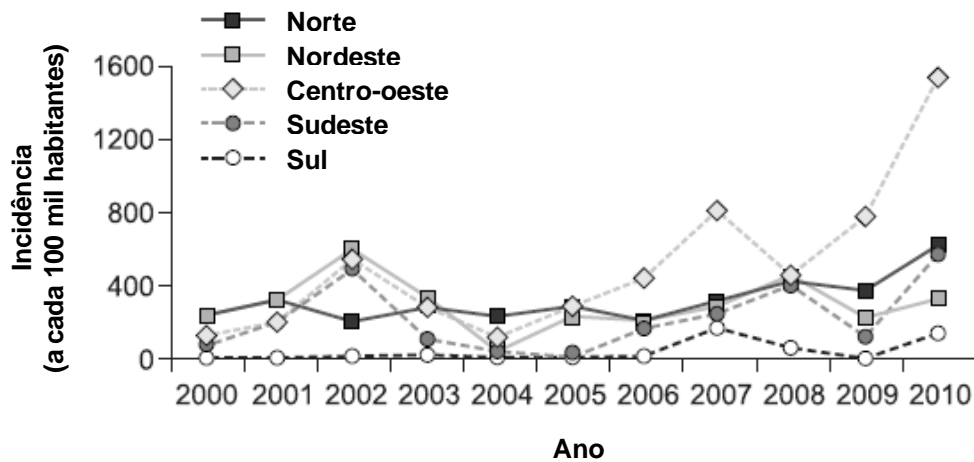
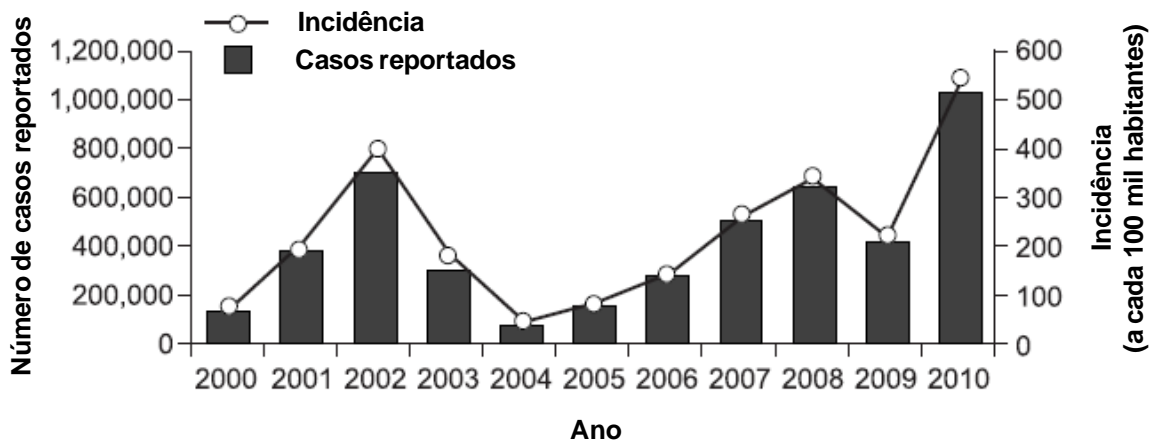


Figura 1.2. Incidência e número de casos no Brasil durante o período de 2000 a 2010. Número de casos e incidência a cada 100 mil habitantes reportados no território nacional (acima) e incidência em cada região (abaixo). Modificado de Teixeira et al., 2013.

1.2. Implicações clínicas na dengue

O vírus DENV é transmitido aos humanos através da picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A maioria das infecções por DENV são assintomáticas ou oligossintomáticas. A manifestação clínica clássica da infecção, a febre do dengue (FD), é uma doença aguda que dura aproximadamente de quatro a sete dias. Sintomas como febre, calafrios e mal estar são comuns, entretanto, dores retro-orbitais com cefaléias e mialgias são sintomas mais característicos da doença. Outras manifestações corriqueiras incluem leucopenia, trombocitopenia e aumento das transaminases hepáticas (Guzmán e Kouri, 2002). Os sinais e sintomas da infecção são autolimitantes na maioria dos casos, entretanto, em cerca de 5 % dos casos a doença pode progredir para um quadro com manifestações hemorrágicas e extravasamento de plasma que surgem geralmente no período de defervescência (Reiter, 2010). Neste quadro é caracterizado acúmulo importante de líquido na cavidade torácica e peritoneal devido ao aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de plasma. O aumento da permeabilidade vascular resulta em redução de volemia, hemoconcentração, redução de suprimento sanguíneo aos órgãos vitais, efusão pleural, que conjuntamente podem culminar em choque, levando o indivíduo ao óbito (Rothman, 2011).

A febre hemorrágica (FHD) e a síndrome do choque (SSD) do dengue constituem as principais formas de dengue grave e estão intimamente relacionadas. Em uma abordagem classificatória, a FHD é enquadrada em quatro níveis com manifestações que variam desde o teste positivo do torniquete até a pressão sanguínea indetectável. Nesta abordagem, os níveis três e quatro de FHD são relativos à SSD e resultam em mortalidade de 9 a 47 % destes pacientes (WHO, 2009; Ross, 2010). Como na prática clínica existe muita dificuldade na aplicação de critérios diferenciadores de FD, FHD e SSD, os quais visam identificar aquelas pessoas que necessitam de amparo médico urgente, propôs-se uma nova classificação. Nesta classificação a febre do dengue foi subdividida primordialmente em dois grupos: dengue com ou sem sinais de alerta. Os sinais de alerta servem para nortear cuidados

médicos para um indivíduo que apresenta maior chance de progredir para uma forma grave da doença e incluem manifestações como: dor abdominal, sangramento de mucosa, hepatomegalia e aumento de hematócrito (Tabela 1.1) (WHO, 2009).

Tabela 1.1. Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS.

Dengue sem sinais de alerta: febre com dois dos sintomas abaixo
<ul style="list-style-type: none">- náusea, vômito- <i>rash</i>- dores- teste do torniquete positivo
Dengue com sinais de alerta: a definição acima com um dos sintomas abaixo
<ul style="list-style-type: none">- dor abdominal persistente- sinais neurológicos como: letargia, inquietação, dores de cabeça.- vômito persistente- acúmulo de líquidos- sangramento de mucosas- letargia, prostração- hepatomegalia- aumento de hematócrito com uma queda rápida de contagem de plaquetas
Dengue Grave: pelo menos um dos parâmetros abaixo
<ul style="list-style-type: none">- extravazamento de plasma levando a: SSD, acúmulo de fluídos associados à dificuldade respiratória- comprometimento grave de órgãos: grande aumento dos níveis das enzimas hepáticas: AST ou ALT > 1000 U/ml ou alterações de consciência, falha cardíaca e de outros órgãos

OMS – Organização Mundial de Saúde; DSS – síndrome do choque da dengue; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase (Adaptado de Narvaes et al., 2011).

1.3. Agente etiológico e ciclo replicativo

O vírus DENV, juntamente com outros arbovírus como o vírus Oeste do Nilo, o vírus da febre amarela e o vírus da encefalite japonesa, é um vírus de RNA pertencente ao gênero *flavivirus* da família *Flaviviridae* e guarda aproximadamente 65% de homologia entre os quatro sorotipos descritos (Burke e Monath, 2001; Lindenbach e Rice, 2001). O DENV é um vírus relativamente pequeno com diâmetro que varia de 500 a 550 Å, dependendo da temperatura e pH do meio o qual se encontra (Zhang et al., 2013). Ele é composto por um envelope de bicamada lipídica que contém em sua superfície as glicoproteínas E (envelope) e M (membrana), envolvendo um nucleocapsídeo icosaédrico composto pelo genoma em conjunto com múltiplas cópias da proteína C (capsídeo). O vírus imaturo surge antes da etapa de processamento de clivagem proteolítica da proteína M e apresenta superfície estruturalmente diferenciada das partículas maduras (Figura 1.3 A, B e C). O genoma viral possui tamanho de 10,7 kb e constitui um RNA de fita simples com polaridade positiva, apresentando uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês: *open reading frame*). O RNA viral apresenta-se modificado em sua extremidade 5' UTR (do inglês: *untranslated regions*), através da adição de uma estrutura cap (m7G5'ppp5'A). Entretanto, este RNA não contém uma cauda poliadenilada na extremidade 3' UTR. Ambas as regiões 5' e 3' UTRs do genoma exercem funções importantes na regulação da síntese e tradução do RNA viral (Whitehead et al., 2007). A tradução do genoma origina uma poliproteína, sendo esta posteriormente clivada, por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro, em 10 proteínas virais: três proteínas estruturais (E, prM e C) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Lindenbach e Rice, 2001) (Figura 3D).

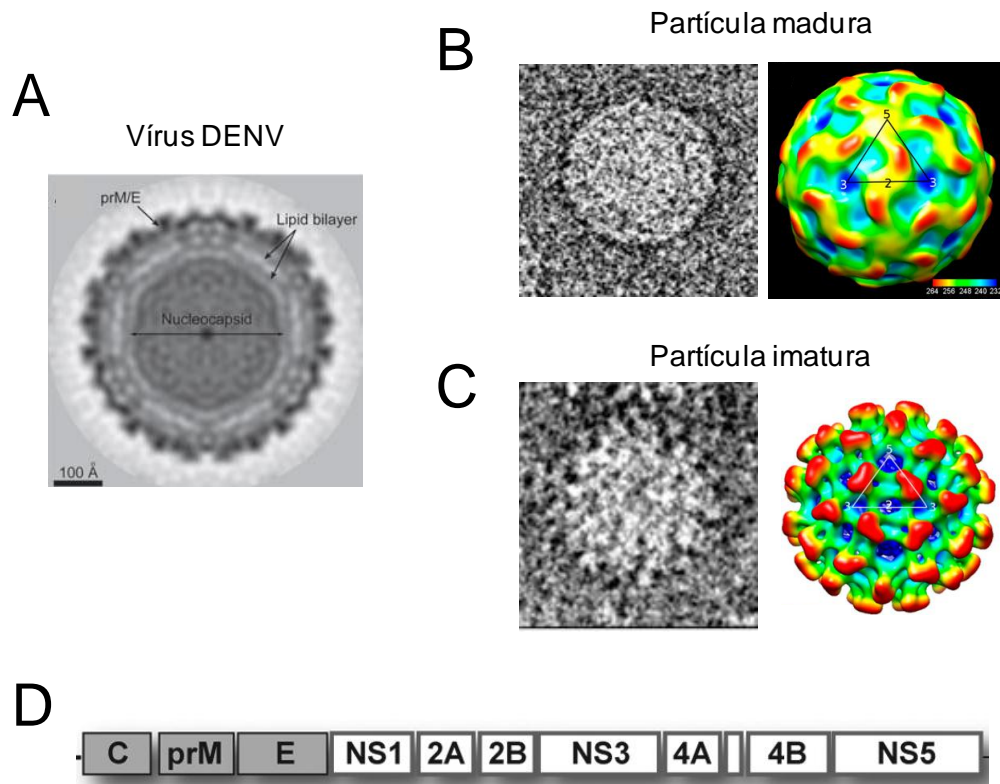


Figura 1.3. Estrutura e genoma do DENV. (A) Imagem de microscopia crioelétrica evidenciando a estrutura do DENV imaturo composta por um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope de bicamada lipídica onde são inseridas as proteínas E e prM. Microscopia crioelétrica (esquerda) e reconstrução computacional (direita) do (B) vírus maduro e do (C) vírus imaturo exibindo sua estrutura diferenciada. Triângulos representam a unidade icosaédrica. (D) Representação do genoma viral exibindo as proteínas virais estruturais (em fundo cinza) e não estruturais (em fundo branco). Modificado de Yu et al., 2008; Iglesias e Garmanik, 2011; Zhang et al., 2013.

Em humanos, o DENV infecta inicialmente células de linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, e posteriormente diversas outras células como endoteliais e hepatócitos (Jessie et al., 2004; Balsitis et al., 2009). Mais recentemente, foi observado em estudos com casos fatais humanos que o vírus também infecta outras células como pneumócitos e fibras musculares cardíacas (Póvoa et al., 2014). Vários receptores foram propostos em diferentes células de mamíferos, incluindo o heparan sulfato, proteínas do choque térmico (Hsp70 e Hsp90), GRP78/Bip,

CD14, receptor de laminina, CLEC5A (do inglês: *C-type lectin domain family 5A*), DC-SIGN (do inglês: *DC (dendritic cell)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin*), entre outros (Clyde et al., 2006; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Murrell et al., 2011). Em uma infecção primária, o vírus penetra na célula alvo através de um mecanismo de endocitose mediado por clatrina (Acosta et al., 2008; van der Schaar et al., 2008), e durante uma infecção secundária, além deste mecanismo, os vírus complexados com anticorpos pré-formados também podem ser internalizados via receptores Fcγ (Littau et al., 1990). Uma vez internalizado em vesículas na célula, ocorre uma mudança do pH intravesicular que acarreta na alteração conformacional da proteína E, passando da forma de dímero para trímero e expondo o peptídeo de fusão, que viabiliza a fusão entre as membranas celular e viral, e acarreta na liberação do RNA viral para o citoplasma (Modis et al., 2004; Zaitseva et al., 2010). No citoplasma, o genoma viral desnudo, livre do capsídeo, estabelece um processo infeccioso. Tal genoma, que compreende um RNA de fita simples com polaridade positiva, se comporta como um RNA mensageiro (RNAm). Inicialmente, ocorrem às primeiras traduções do RNA viral e processamento da poliproteína nas membranas do RE, com produção das proteínas flavivirais. Em especial, a NS5 produz cópias de RNA de polaridade negativa, a partir do RNA viral, as quais servem de molde para a síntese de novas fitas positivas, que serão incorporadas às novas partículas virais (Clyde et al., 2006; Fernandez-Garcia et al., 2009). Os genomas recém-formados são então empacotados com a proteína C e posteriormente envoltos por proteínas E em um mosaico dimérico antiparalelo e prM. Estes novos vírions entram na rede trans-Golgi, onde sofrem ação da furina (protease do hospedeiro), que cliva a proteína prM gerando partículas virais maduras ou parcialmente maduras, as quais por fim são secretadas para o meio extracelular podendo infectar outras células (Yu et al., 2008) (Figura 1.4).

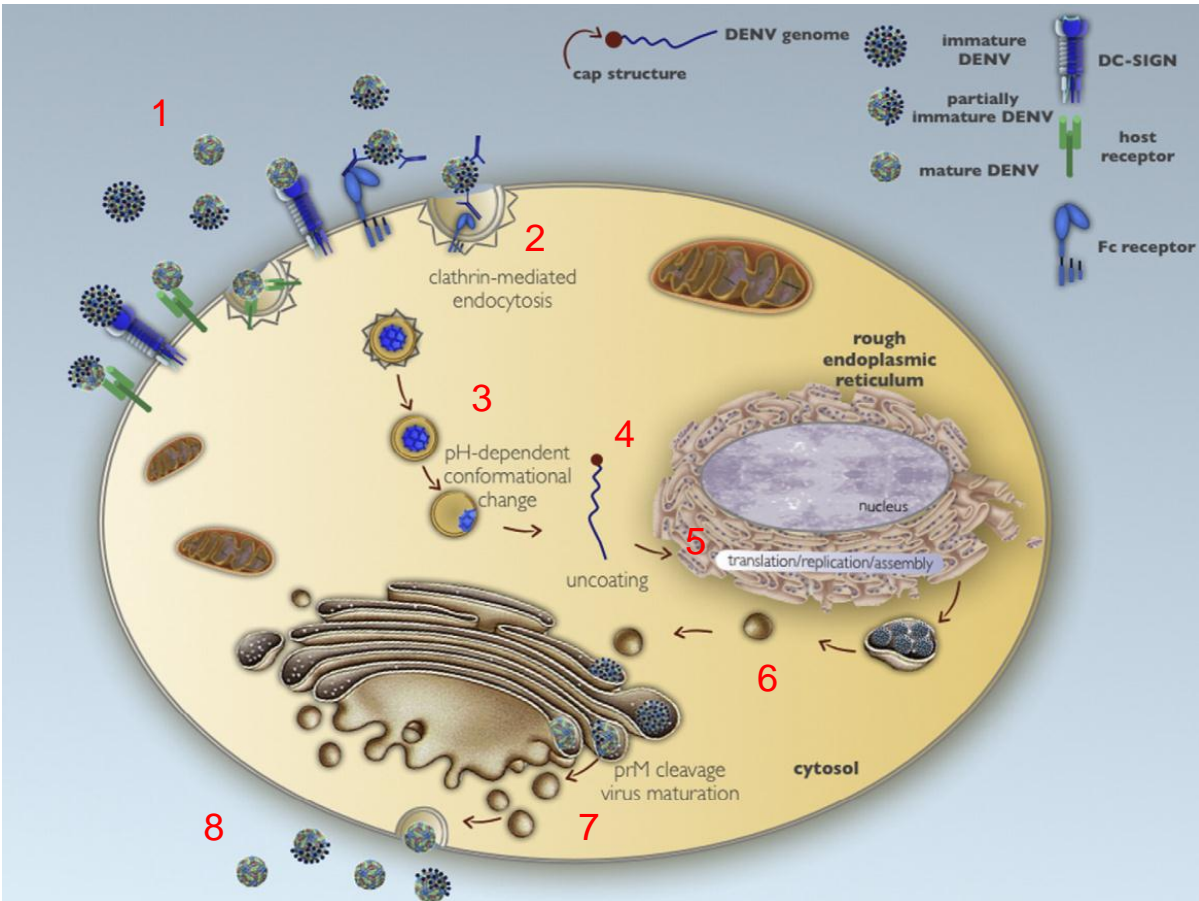


Figura 1.4. Ciclo de replicação do DENV. Esquema representativo do ciclo de replicação do DENV em uma célula susceptível. (1) O vírus DENV interage diretamente com receptores presentes na superfície da célula alvo ou indiretamente com os receptores Fc γ quando complexado com anticorpos em concentrações sub- ou não-neutralizantes oriundos de infecções anteriores. (2) A partícula é internalizada em uma vesícula mediante um mecanismo envolvendo clatrin, (3) dentro da qual ocorre alteração de pH levando a fusão das membranas viral e celular e a (4) consequente liberação do genoma viral para o citosol. (5) O processo de replicação do genoma viral e a montagem de novas partículas ocorrem no retículo endoplasmático e (6) posteriormente os vírions formados são direcionados para a rede trans-Golgi. (7) No complexo de Golgi a furina, uma protease celular, cliva a prM em M originando partículas maduras ou parcialmente maduras (8) as quais são exocitadas podendo infectar outras células. Modificado de Green et al., 2014.

1.4. Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) é extremamente básica e se complexa com o RNA viral para formar o nucleocapsídeo. Além de ser um componente estrutural, a proteína C participa da montagem da partícula viral (Chambers et al., 1990; Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Também foi observado que células infectadas com DENV apresentam proteínas C localizadas ao redor de gotículas lipídicas derivadas do RE, e foi demonstrado que tal localização é crucial para a formação de partículas virais (Samsa et al., 2009).

A proteína M é pequena (7-9 KDa) e está presente no envelope lipídico do DENV maduro. Primariamente, ela é sintetizada na forma de sua precursora, uma proteína glicosilada denominada prM (pré-membrana). Aparentemente, a prM participa do processo de maturação e biosíntese da proteína E. Estudos sugerem que a prM atua como uma chaperonina, cuja função é evitar erros de dobramentos na proteína E, durante o processo de maturação viral (Chang, 1997; Stiasny & Heinz, 2006; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

A proteína E destaca-se por ser o maior componente glicoprotéico presente na superfície do DENV, associada a numerosas atividades biológicas importantes. Ela atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície de células alvo e mediando a endocitose da partícula viral. Tal proteína é responsável pela fusão da bicamada lipídica do vírus à membrana citoplasmática da vesícula endossômica e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Chang, 1997; Lindenbach & Rice, 2001).

A NS1 é uma glicoproteína que possui peso molecular de aproximadamente 45-48 KDa. Essa proteína não estrutural é secretada e detectada em grandes quantidades no soro de indivíduos infectados com DENV. Tal característica peculiar fez da NS1 um dos principais marcadores utilizados no diagnóstico precoce da dengue (Young et al., 2000, Hu et al., 2011). Além disso, a proteína NS1 também pode ser encontrada no interior de células infectadas ou ancorada a sua superfície, através de uma sequência hidrofóbica que corresponde à região N-terminal da proteína NS2A, e que funciona

como uma sequência sinal capaz de interagir com uma cauda GPI (Glicosil-Fosfatidil-Inositol), formando assim uma âncora GPI-NS1 (Jacobs et al., 2000). Também foi demonstrado que células transfectadas com a vacina de DNA pcTPANS1ANC, que possui o gene da NS1 e a sequência que corresponde à região N-terminal da proteína NS2A, apresenta a proteína NS1 associada em sua superfície celular, observado por microscopia eletrônica de transmissão (Costa et al., 2007). Pouco se sabe sobre o papel biológico da NS1, embora ela seja essencial para a viabilidade do DENV. Alguns estudos sugerem que a NS1 está envolvida nos processos de replicação, provavelmente interagindo com outras proteínas e formando um complexo replicativo (Lindenbach & Rice, 2001; Assenberg et al., 2009). Outros autores, com base em outros flavivírus, sugerem o envolvimento da proteína NS1 de DENV na ativação/regulação de proteínas do sistema complemento. A NS1 poderia interagir com o fator H do sistema complemento impedindo assim sua ação no início da infecção, o que favoreceria a produção de mais partículas virais (Chung et al., 2006). Por outro lado, em um segundo momento, esta proteína parece atuar como fixador do sistema complemento, podendo, e a partir daí, potencializar seu efeito (Shresta, 2012).

A NS2A, a NS2B, a NS4A e a NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas à membrana e/ou a outras proteínas para exercerem seus papéis biológicos, envolvidos no ciclo replicativo do DENV. A NS4B aparentemente modula a replicação viral através da interação com outra proteína não estrutural, a NS3. Além disso, a NS4B pode estar associada à inibição da resposta de interferons (IFN do tipo 1) em indivíduos infectados (Lindenbach & Rice, 2001; Umareddy et al., 2006). Em particular, a NS2B atua como cofator da NS3 para formar uma serino-protease ativa (NS2B-NS3), que cliva junções protéicas na poliproteína viral (Melino & Paci, 2007).

A NS3 (69-70 KDa) possui aproximadamente 618 aminoácidos e é caracterizada como uma proteína multifuncional com atividades de serino-protease (NS2B-NS3), na sua porção N-terminal; de helicase (atua na dissociação da dupla fita de RNA sendo potencializada quando a NS3 está associada a NS4B durante a replicação do RNA viral); de NTPase (hidrolisa ATP para fornecer energia durante os processos de replicação); e de RTPase (atua provavelmente removendo o grupo fosfato da região 5'

N-terminal que parece estar envolvido no processo de adição da estrutura cap na extremidade 5' UTR do genoma viral), estando estas últimas atividades presentes na sua porção C-terminal. Além disso, a interação NS3/NS5 pode estimular as atividades enzimáticas da proteína NS3 (nas porções helicase e NTPase). Em resumo, a NS3 exerce um papel fundamental no ciclo de vida dos flavivirus, participando ativamente do processamento da poliproteína e nos processos de replicação do RNA viral (Lindenbach & Rice, 2001; Umareddy et al., 2006; Melino & Paci, 2007; Assenberg et al., 2009).

A proteína mais conservada dentro dos Flavivírus é a NS5 (103 KDa) (Lindenbach & Rice, 2001). Ela possui um motivo metiltransferase localizado na sua porção N-terminal. Tal motivo é responsável pela adição do cap e pela metilação da extremidade 5' UTR e, como citado acima, a NS3 parece cooperar com a NS5 nesse processamento (Assenberg et al., 2009). Já na porção C-terminal da NS5 localiza-se uma sequência com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, do inglês: RNA-dependent RNA polymerase) responsável pela replicação, sintetizando cópias negativas e positivas do RNA viral. As fitas negativas servem de molde para a transcrição das fitas positivas de RNA que serão utilizadas para a tradução de novas poliproteínas e/ou seguirão para a montagem do nucleocapsídeo das partículas virais (Lindenbach & Rice, 2001; Qi et al., 2008; Melino & Paci, 2007).

1.5. Resposta imune

Interferons do tipo I, IFNs- α/β , constituem reguladores importantes da imunidade inata durante as infecções virais. São secretados por muitos tipos celulares após uma infecção viral e estimulam a expressão de genes em células adjacentes com efeitos antivirais importantes, conhecidos como genes estimulados por interferons (ISGs do inglês: *interferon stimulated genes*) (Randall & Goodbourn, 2008). Avanços consideráveis foram alcançados nos últimos anos com relação à compreensão dos mecanismos antagônicos desenvolvidos pelos flavivirus contra a atividade do IFN. Foi visto que um pré-tratamento de células com IFNs α/β inibe a replicação dos flavivirus *in*

vitro, enquanto que o mesmo tratamento após a infecção é muito menos eficaz para conter a replicação viral (Diamond et al., 2000; Anderson et al., 2002; Best et al., 2005). Além disso, em modelos animais ou em humanos infectados com JEV ou WNV, observa-se uma pequena janela terapêutica no tratamento com IFN- α (Chan-Tack et al., 2005; Kalil et AL., 2005). Estas observações podem ser explicadas pela existência de estratégias eficazes, empregadas pelos flavivirus, para escapar ou atenuar os mecanismos efetores induzidos pelos IFNs- α/β . Camundongos geneticamente deficientes de receptores para IFNs tipo I e II são altamente suscetíveis à infecção primária por DENV (Shresta et al., 2004; Ho et al., 2005). Alguns trabalhos sugerem que as proteínas não estruturais do DENV, a NS2A, NS4A, NS4B e NS5 estão envolvidas na inibição da resposta inata antiviral impedindo a produção de IFN- α (Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Julander et al., 2011). Mais recentemente, foi observado que durante a infecção em células dendríticas, o vírus pode levar ao impedimento da ativação de NF- κ B e da produção de algumas citocinas (Chang et al., 2013). Além disso, foi visto também que a proteína NS2b tem ação proteolítica sobre a proteína adaptadora STING (do inglês: *stimulator of the interferon gene*), a qual participa do processo de de ativação da via dos IFNs α/β (Aguirre et al., 2012). Em relação ao IFN- γ , não há um consenso quanto a sua participação no agravamento da doença. Há trabalhos que o associam à gravidade da doença, sendo encontrado em níveis mais elevados em pacientes com dengue grave (Kurane et al., 1994; Bozza et al., 2008; Priyadarshini et al., 2010). Já outros estudos apontam um efeito protetor desta citocina, sendo encontrado em níveis aumentados em pacientes com DF quando comparados aos com FHD (Chaturvedi et al., 2000; Braga et al., 2001; Chakravati & Kumaria, 2006).

A resposta imune humoral se desenvolve aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado com DENV (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Atualmente, os anticorpos são reconhecidos como elementos importantes na proteção contra a infecção, uma vez que estes podem bloquear a entrada do vírus nas células alvo ou interferir no mecanismo de fusão. Além da neutralização, os anticorpos podem recrutar a ação de células efetoras ou do complemento, ocasionando a lise das células

infectadas (Cedillo-Barrón et al., 2014). Na infecção primária, inicialmente ocorre um aumento dos níveis de imunoglobulinas M (IgM) específicas para antígenos de DENV, as quais geralmente persistem no soro dos indivíduos por 30-90 dias. A partir do décimo dia de infecção há um aumento dos níveis IgG específicas, principalmente IgG1 e IgG3, que podem ser detectadas por muitos anos em indivíduos com histórico de dengue (Guzmán & Vazquez., 2010; Nagesh et al., 2011; Cedillo-Barrón et al., 2014). A maioria dos anticorpos são direcionados contra as proteínas estruturais E e prM/M e contra a NS1 (Kinney & Huang, 2001). A proteína E apresenta-se como um forte imunógeno, capaz de induzir 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).

A infecção com um dos quatro sorotipos do DENV induz imunidade duradoura contra o sorotipo infectante. Apesar de ser gerada uma resposta imune cruzada entre os sorotipos heterólogos que pode ser protetora, esta proteção é de curta duração (alguns meses) contra os sorotipos heterólogos (Murphy & Whitehead, 2011). Sendo assim, naturalmente ocorrem infecções sequenciais com os diferentes sorotipos virais, principalmente nas regiões onde há co-circulação de vários DENV (Laoprasopwattana et al., 2007; Yauch et al., 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Diversos estudos evidenciaram que estas infecções sequenciais ao invés de conferir proteção aos indivíduos levam a uma maior incidência dos casos mais graves de dengue (Rothman & Ennis, 1999; Vaughn et al., 2000; Hasteed, 2007; Duangchinda et al., 2010), entretanto a patogênese da dengue hemorrágica é complexa e ainda não está bem definida. Alguns autores apontam a importância de fatores de risco para a ocorrência dos casos graves, que incluem a variação genética de cepas virais infectantes, idade, etnia, condições imunológicas e a predisposição genética do paciente (Guzmán & Kouri, 2002; Rothman, 2004; Chaturvedi et al., 2006).

Entretanto, dados epidemiológicos sugerem que os casos graves são geralmente mediados pela resposta imune do hospedeiro. Estudos feitos na Tailândia demonstraram que mais de 99% dos casos de FHD apresentam anticorpos

heterotípicos ao sorotipo do vírus que provocou a doença (Halstead et al., 1988). Após a primeira infecção, formam-se os anticorpos homotípicos para aquele sorotipo. Na infecção subsequente com um sorotipo diferente, estes anticorpos poderiam se ligar ao vírus formando um complexo vírus anticorpo que, além de não neutralizar a partícula, ainda facilitaria a infecção de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Neste processo, a porção Fc da molécula de imunoglobulina ligada ao vírus reconheceria receptores Fcγ presentes na superfície de tais células, promovendo a fagocitose dos mesmos e aumentando a eficiência da infecção. Este fenômeno é conhecido como aumento da replicação viral dependente de anticorpos (ADE: do inglês, *antibody dependent enhancement*) (Figura 1.5) (Halstead et al., 1988, 2007; Mathew & Rothman, 2008). Alguns autores sugerem que o ADE também envolve mecanismos intracelulares para a evasão viral contra a imunidade inata, possivelmente interferindo na silanização de proteínas de reconhecimento padrão (Modhiran et al., 2010;), e também atenuando a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-12 e IFN-γ (Chareonsirisuthigul et al., 2007).

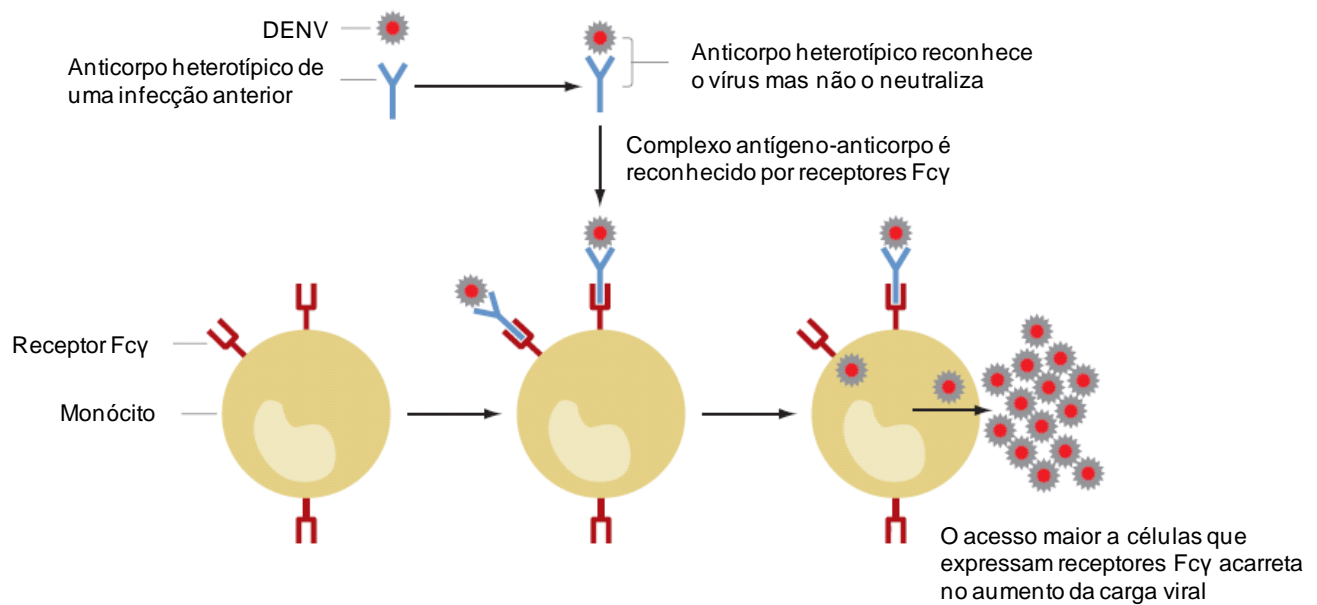


Figura 1.5. Representação esquemática do mecanismo de ADE. Modificado de Murphy & Whitehead, 2011.

Anticorpos contra as proteínas não estruturais 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 pode se apresentar associada à superfície de células infectadas com DENV (Miller, 2010). Durante o período febril, geralmente são detectados altos níveis de NS1 no soro dos pacientes com dengue e a proteína NS1 solúvel também mostrou habilidade de ativar diretamente o sistema complemento (Avirutnan et al., 2006). Tal ativação leva a produção do complexo C5b-9 solúvel que pode estar associado aos casos graves de dengue, promovendo o aumento da permeabilidade de células endoteliais (Avirutnan et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que anticorpos anti-NS1, gerados contra a proteína recombinante expressa em *Escherichia coli*, podem apresentar reação cruzada com plaquetas ou causar apoptose em células endoteliais (Lin et al., 2002). Por outro lado, a proteína NS1 tem sido indicada como um antígeno promissor para o desenvolvimento de

vacinas contra a dengue, ativando resposta imune protetora em modelos experimentais (Schlesinger et al., 1987; Wu et al., 2003; Liu et al., 2006; Costa et al., 2006; Costa et al., 2007). Sendo assim, a participação da NS1 nesses mecanismos biológicos pode contribuir tanto para a imunopatogênese da doença bem como para a ativação de uma resposta imune protetora.

Outra explicação para o agravamento da doença em casos de infecção secundária é a teoria do pecado antigênico original. Esta hipótese postula que durante uma reinfecção, uma expansão de células T de memória com características de baixa avidéz e reatividade cruzada geradas na primeira infecção, dominaria a resposta sobre as células T naïve de alta avidéz pra o sorotipo da infecção atual. Estes clones heterólogos ativados levariam a uma resposta imune ineficiente caracterizada por uma redução na atividade citotóxica e aumento nos níveis de citocinas inflamatórias (Mongkolsapaya et al., 2003; Mathew & Rothman, 2008; Weiskopf & Sette, 2014). Entretanto, esta hipótese é conflitante com a observação de que nem sempre uma resposta heteróloga de células T é necessária para que seja observado o desenvolvimento das formas graves da doença. A FHD e a SSD, em crianças residentes de áreas endêmicas, é observada entre os 6 e 12 meses de idade. Nestes casos estes indivíduos possuem um risco maior de desenvolver as formas graves da dengue em virtude da queda dos títulos dos anticorpos maternos contra o DENV, atingindo concentrações não protetoras (Weiskopf & Sette, 2014).

Outro aspecto bastante estudado na patogênese da dengue é o papel das citocinas. Uma série de estudos tem sugerido que o extravazamento plasmático é causado pelo mau funcionamento das células do endotélio vascular, induzido por citocinas e não pela ação direta do vírus (Grenn & Rothman, 2006; Srikiatkachorn et al., 2007). A natureza do extravazamento de plasma e sua associação com o período da defervescência, inicialmente sugeriram que fatores circulantes seriam responsáveis pelo fenômeno. Relatos científicos mostraram que níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e vasoativas encontram-se elevadas em pacientes com FHD antes e depois do extravazamento de plasma, sendo o nível de elevação diretamente correlacionado com a gravidade da doença (Rothman, 2011). Como também

observado em casos de infecções por vírus influenza e hantavírus, o cenário proposto é que durante uma reação imunológica exacerbada seja gerada uma hiperprodução de citocinas (também atribuída como “tempestade de citocinas”) que resultaria no aumento de permeabilidade vascular (Rothman, 2011).

Concentrações elevadas de diversas citocinas têm sido relacionadas a uma maior ou menor gravidade da doença em pacientes com dengue. O TNF- α , produzido principalmente por macrófagos, é amplamente associado às formas graves da doença, visto que níveis aumentados são encontrados em pacientes com FHD em relação aos com FD (Hober et al., 1993; Kubelka et al., 1995; Azeredo et al., 2001; Chakravati & Kumaria, 2006). Entretanto, outros grupos mostraram não haver uma correlação direta entre os níveis de TNF- α e DHF, e sim uma associação à trombocitopenia (Bethell et al., 1998; Bozza et al., 2008).

A IL-10 é sintetizada mais tardiamente na infecção por DENV, podendo ser um eventual mecanismo de regulação natural contra o excesso de proteínas inflamatórias e atenuando o processo inflamatório, já que ela pode inibir a síntese de citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 e diminuir a expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias (Chaturvedi et al., 2000). Por outro lado, altos níveis de IL-10 estão correlacionados com baixos níveis de plaquetas, podendo então estar contribuindo com sangramentos observados nos casos graves de dengue (Azeredo et al., 2001).

1.6. Vacinas contra a dengue

Para que se garanta a eficácia e a segurança de uma vacina anti-dengue, acredita-se que esta deva ser capaz de induzir respostas imunes com níveis de proteção homogêneos e simultâneos contra os quatro sorotipos do DENV, uma vez que tais sorotipos, apesar de relacionados, apresentam antigenicidade diferente e evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que os quadros mais graves da dengue estão relacionados à infecção secundária (Vaughn et al., 2000). Portanto, é desejável que uma vacina tetravalente contra a dengue promova proteção total, pois

uma proteção parcial e desbalanceada contra um dos sorotipos de DENV poderia tornar os indivíduos vacinados mais suscetíveis à dengue grave. Atualmente, não existe nenhuma vacina anti-dengue licenciada para uso em massa e vários protótipos vacinais estão sendo testados em ensaios clínicos (Thisyakorn U & Thisyakorn C, 2014).

A primeira vacina tetravalente anti-dengue avaliada em ensaios clínicos foi baseada na abordagem vacinal clássica de vírus atenuado. Este primeiro protótipo vacinal foi desenvolvido na Tailândia, na Universidade de Mahidol, licenciada à Aventis Pasteur, atual Sanofi Pasteur. O protótipo era composto de cepas virais atenuadas por passagens sequenciais em células renais de cães (PDK, do inglês: *primary dog kidney cells*) ou em células renais de macacos (Vero) (Sabchareon et al., 2002). Outro protótipo vacinal produzido nesta mesma abordagem clássica foi desenvolvido nos EUA e licenciado à GlaxoSmithKline (GSK) na Inglaterra. Este protótipo vacinal da GSK é composto de cepas virais obtidas por atenuação em passagens sequenciais em células PDK e células de pulmão de feto de macacos rhesus (células FRhL, do inglês: *fetal rhesus lung cells*) (Sun et al., 2003). Quando estas preparações foram testadas como vacinas monovalentes, elas foram capazes de induzir altas taxas de soroconversão. Entretanto, em uma formulação tetravalente, uma interferência entre os quatro sorotipos virais atenuados constituiu um grande obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina. Com a inoculação de uma dose, a soroconversão contra os quatro sorotipos do DENV foi de apenas 30% (Sabchareon et al., 2002; Sun et al., 2003), entretanto esta taxa aumentou para 60-70% com a utilização de doses adicionais (Sabchareon et al., 2002; Sun et al., 2009). Além desta interferência viral, foi observado também que um grande número de participantes do ensaio desenvolveu sintomas semelhantes aos da dengue, o que acarretou na interrupção dos testes com este protótipo vacinal (Sabchareon et al., 2002; Kitchener et al., 2006).

Com o uso da tecnologia de engenharia genética foi possível desenvolver novas vacinas quiméricas, e foi com esta abordagem vacinal que foi produzida a vacina contra a dengue que mais avançou nos ensaios clínicos. Produzida pela Sanofi Pasteur, a vacina tetravalente, CYD-TDV, batizada como ChimeriVAX™, é composta

por vírus quiméricos que contém os genes prM/E derivados de cada sorotipo do DENV carregados em um “esqueleto” representado pelo vírus vacinal contra a febre amarela (YFV-17D) (Tabela 1.2) (Guy et al., 2010). Ensaios pré-clínicos de fase I e fase II demonstraram que o ChimeriVAX™ foi capaz de induzir altos níveis de soroconversão (77-100%), com produção robusta de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos virais com o uso de três doses vacinais em voluntários saudáveis (Guy et al., 2011; Morrison et al., 2010). Embora promissor, estudo executado na Tailândia para avaliar a eficácia da vacina (ensaio clínico de fase IIb) demonstrou a inesperada baixa eficácia desta preparação contra a infecção por DENV2 (Sabchareon et al., 2012). Neste estudo, os autores observaram que apesar das crianças apresentarem níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra DENV2, elas não se tornaram protegidas. Mais recentemente, foi relatado o estudo de fase III na Ásia, com mais de 10.000 crianças da Indonésia, Malásia, Filipinas, Tailândia e Vietnã, que demonstrou uma eficácia de aproximadamente 57 % desta vacina tetravalente quando analisada de um modo geral (Capeding et al., 2014). Entretanto, quando foram analisados os episódios de dengue relativos a cada sorotipo, verificou-se proteção acima de 75% para os sorotipos 3 e 4, enquanto que para os sorotipos 1 e 2 a eficácia da vacina foi de 50 % e 35 %, respectivamente. Não obstante, a vacinação parece ter prevenido o aparecimento das formas mais graves da doença, com uma eficácia de 88 % contra FHD. Tais estudos foram realizados até um mês após a última dose da vacina (total de 2 anos). Os autores apontam que novos estudos serão necessários, com um acompanhamento em longo prazo (por mais quatro anos), para a verificação da longevidade da proteção conferida pela vacina e/ou o aparecimento de formas graves da doença.

Outra vacina quimérica tetravalente, a DENVax, foi inicialmente desenvolvida pelo CDC (Inviragen, USA e Takeda, Japão). Esta vacina foi construída utilizando o vírus DENV-2, atenuado por passagem em cultura de células (cepa 16681-PDK53), como o “esqueleto” carreador (Osorio, et al., 2011). Os genes prM/E de DENV2 foram substituídos pelos correspondentes genes dos outros sorotipos (Tabela 1.2). Ensaios

pré-clínicos revelaram que esta vacina tetravalente é altamente segura e imunogênica (Osorio, et al., 2011).

Em uma abordagem diferente de atenuação, um candidato vacinal foi produzido mediante a deleção de nucleotídeos na região não traduzida 3'-UTR do DENV. Esta estratégia foi utilizada no NIH (do inglês: *National Institute of Health*) nos EUA. Tanto o DENV-1 como o DENV-4 contendo uma deleção de 30 nucleotídeos na região 3'-UTR (rDEN1 Δ 30 e rDEN4 Δ 30, respectivamente) foram atenuados, porém mantiveram sua imunogenicidade em macacos rhesus e em humanos (Durbin et al., 2011). A deleção Δ 30 gerou apenas uma atenuação parcial no DENV-2 e praticamente não atenuou o DENV-3, fato verificado por testes em macacos rhesus. Neste caso, uma estratégia de quimerização foi utilizada para criar novos candidatos. Os genes prM/E de DENV-2 e DENV-3 foram substituídos pelos genes correspondentes no “esqueleto” rDEN4 Δ 30 (rDEN2/4 Δ 30 e rDEN3/4 Δ 30, respectivamente) (Durbin et al., 2011). Individualmente, estes candidatos mostraram ser capazes de induzir soroconversão sem ocorrência de eventos adversos em humanos (Durbin et al., 2011; Lindow et al., 2013). Diversas formulações tetravalentes foram avaliadas com base nessa abordagem em ensaios clínicos de fase I. Uma das formulações contendo rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 e rDEN4 Δ 30 foi capaz de induzir uma resposta balanceada de anticorpos, com taxas de soroconversão para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 de, respectivamente, 100%, 50%, 85% e 100% (Durbin et al., 2013). Novas avaliações com esta abordagem vacinal estão sendo realizadas no Brasil e na Tailândia.

Em uma abordagem vacinal alternativa, subunidades protéicas associadas a adjuvante são utilizadas como imunógenos. Um candidato desenvolvido pela Hawaii Biotech, agora integrada à empresa Merck, consiste em uma combinação de subunidades protéicas recombinantes contendo a proteína prM inteira junto com 80% da proteína E, ambas derivadas de cada um dos quatro sorotipos do DENV, expressas em cultura de células de *Drosophila melanogaster* (protótipo batizado como DEN-80Es) (Coller et al., 2011). Uma formulação tetravalente avaliada em camundongos e macacos mostrou que o DEN-80Es induz soroconversão contra os quatro sorotipos

virais (Coller et al., 2011). Entretanto, os ensaios clínicos para esta abordagem ainda se encontram em fase I, com testes de candidatos monovalentes (WHO, 2014).

Abordagens com vacinas de DNA também são utilizadas na busca de uma ferramenta preventiva anti-dengue. Com base nesta estratégia, uma vacina tetravalente contendo plasmídeos que codificam os genes prM/E dos 4 sorotipos do DENV foi desenvolvido nos EUA pelo Centro Naval de Pesquisas Médicas (*Naval Medical Research Center*) e pela Vical Inc. Nos resultados de ensaios clínicos de fase I, onde foi testada uma vacina de DNA monovalente contra DENV-1, aproximadamente 42% dos voluntários apresentaram níveis detectáveis porém baixos de anticorpos neutralizantes (Beckett et al., 2011). Recentemente, uma nova formulação tetravalente utilizada em conjunto com o adjuvante Vaxfectin® mostrou aumento de imunogenicidade em primatas não-humanos (Porter et al., 2012). Dessa forma a abordagem vacinal onde se utiliza a vacina de DNA combinada ao Vaxfectin® progrediu para os ensaios clínicos de fase I (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Protótipos vacinais tetravalentes contra a dengue.

Tipo	Fabricante	Estratégia	Local de triagem	Fase do estudo	Status
Vacina clássica de vírus atenuado	MU, Sanofi Pasteur	Atenuada em culturas celulares	Tailândia	fase II	suspenso
	WRAIR, GSK	Atenuada em culturas celulares	USA	fase II	suspenso
Vacina de vírus quimérico atenuado	Sanofi Pasteur	Genes prM/E de DENV1-4 substituídos no YFV-17D	Colômbia, México, Honduras, Porto Rico, Brasil, Tailândia, Indonésia, Malásia, Vietnam, Filipinas	fase III	em progresso
	CDC, Inviragen, Takeda	Genes prM/E de DENV1-4 substituídos no DENV-2	Porto Rico, Colômbia, Singapura, Tailândia	fase II	em progresso
	NIAID, NIH	Atenuada por deleção 3'-UTR	Brasil, Tailândia	fase II	em progresso
Vacina protéica	MERK	vacina de subunidades contendo 80% da proteína E de DENV1-4	Austrália	fase I	em progresso
	WRAIR, GSK	vacina inativada purificada	USA, Porto Rico	fase I	em progresso
Vacina de DNA	NMRC, Vical	DNA plasmidial que contém os genes prM/E de cada sorotipo do DENV	USA	fase I	em progresso

MU: Universidade de Mahidol, Tailândia; WRAIR: Walter Reed Army Institute of Research, USA; GSK: GlaxoSmithKline Biologicals; prM: pré-membrana; E: envelope; YFV-17D: cepa vacinal 17D da febre amarela; CDC: Centers for Disease Control and Prevention, USA; NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA; NIH: *National Institute of Health*, USA; UTR: região não-traduzida (untranslated region); NMRC: *Naval Medical Research Center*, USA. (Adaptado de Ishikawa et al., 2014).

1.6.1. Vacinas de DNA

A vacina de DNA apresenta-se como uma eficiente tecnologia usada nos últimos anos, não somente contra diversos agentes infecciosos, mas também contra doenças autoimunes, câncer e alergias (Liu, 2011).

Essa tecnologia compreende a inoculação de um vetor plasmidial de expressão em células eucarióticas contendo o antígeno de interesse, o qual tem por finalidade induzir resposta imune nos indivíduos vacinados (Tang et al., 1992; Liu, 2011). Uma vez no interior da célula, mais especificamente no núcleo, o DNA plasmidial, que se apresenta na forma episomal, é transcrito e o RNAm segue para o citoplasma onde ocorre a tradução de cópias da proteína recombinante. A proteína recombinante pode ser expressa no citoplasma, na superfície celular ou secretada para o meio extracelular, dependendo da estratégia de clonagem utilizada (Costa et al., 2007; Liu, 2011). A expressão endógena do antígeno pelas células transfectadas com o DNA plasmidial parece simular uma infecção viral natural, sendo capaz de gerar tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos, como uma resposta celular, com indução de linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês: *Cytolytic T-lymphocyte*) (Donnelly et al., 1994; Ulmer & Sadoff, 1996; Vogel & Sarver, 1995; Liu 2011). A proteína recombinante sofre processamento e os peptídeos antigênicos gerados podem ser apresentados por complexos de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), ativando assim uma imunidade específica (Liu, 2011). Sabe-se que as células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs, do inglês: antigen-presenting cells) são capazes de apresentar peptídeos antigênicos através das duas vias mencionadas (MHC I e II). Outras células, como as musculares, quando transfectadas expressam eficientemente a proteína recombinante que pode ser processada e apresentada via MHC-I. Entretanto, os miócitos não possuem moléculas co-estimuladoras, expressas em células APCs profissionais necessárias para a completa ativação das células T e, portanto os CTL não podem ser ativados diretamente a partir da expressão do antígeno pelas células musculares. Por outro lado, as APCs próximas ao local de inoculação também podem ser transfectadas diretamente com DNA plasmidial injetado

apresentando assim os peptídeos via MHCI e MHCII. Além disso, alguns estudos demonstraram que o antígeno recombinante expresso em células musculares pode ser transferido para células dendríticas, sendo estas responsáveis por ativar uma resposta imune de CTL, processo este denominado de *cross-priming* (Fu et al., 1997; Dupuis et al., 2000; Liu, 2011).

A indução dos dois braços da resposta imune, humoral e celular, fornece vantagens em comparação às vacinas inativadas e de subunidade que produzem principalmente ou exclusivamente uma resposta de anticorpos. Esta resposta de amplo espectro pode ser comparada à resposta induzida por vacinas vivas atenuadas, entretanto, não apresenta o risco de reversão para forma patogênica do agente infeccioso (Davis & Whalen, 1995; Dertzbaugh, 1998; Liu, 2011). Adicionalmente, uma vantagem de se utilizar vacinas de DNA contra vírus, em relação às vacinas de subunidade, por exemplo, se relaciona à expressão *in vivo* das proteínas virais após a imunização, com modificações pós-tradução que ocorrem durante a infecção natural, como glicosilações, o que leva ao correto enovelamento destas proteínas (Liu, 2011).

A capacidade de ativar uma resposta imune celular pode ser bastante vantajosa no desenvolvimento de vacinas para certas doenças, como quando o agente infeccioso é um patógeno de replicação intracelular, como vírus, visto que CTLs reconhecem e lisam células do hospedeiro infectadas, participando do processo de eliminação da infecção (Ulmer & Sadoff, 1996). A resposta imune gerada por vacinas de DNA também mostrou ser de longa duração, já que estudos com camundongos imunizados com diversos vetores plasmidiais apresentaram uma produção de anticorpos constantes, sendo estes detectados até 18 meses após a inoculação (Davis et al., 1996; Alves et al., 2000; Costa et al., 2006).

A utilização de plasmídeos recombinantes representa uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novas vacinas devido a sua segurança na manipulação, estabilidade a variações de temperatura, menor custo de produção, além de permitir uma rápida seleção de sequências a serem avaliadas (Chang et al, 2001; Liu, 2011). Entretanto, 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 co-administração de plasmídeos que codificam citocinas, adição de sequências imunoestimuladoras, adjuvantes e 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; Azevedo et al., 2013).

1.7. Modelos em camundongos para o estudo da dengue

Compreender mais detalhadamente os mecanismos imunológicos envolvidos na dengue consiste em uma etapa importante no desenvolvimento de vacinas e terapias específicas no combate à doença. Entretanto, a inexistência de um modelo animal imunocompetente que reproduza a infecção em humanos representa um grande empecilho neste progresso. São inúmeros os relatos científicos de modelos em camundongos que apresentam alguns dos aspectos da doença observada em humanos, entretanto em todos eles existem características comumente polemizadas e criticadas no âmbito científico com relação a sua aplicabilidade prática. Isso se dá, pois camundongos imunocompetentes são geralmente resistentes à manifestação dos sintomas induzidos pelo DENV, o que resulta na necessidade de especular: (i) vias não fisiológicas de infecção, (ii) camundongos quiméricos humanizados e (iii) animais com comprometimento do sistema imunológico, sendo todas essas possibilidades dotadas de limitações.

1.7.1. Infecção intra-cerebral com vírus neuroadaptado

Na tentativa de adaptar este patógeno aos roedores, o vírus DENV, isolado de paciente durante epidemias ocorridas no Hawaii e na Nova Guiné, foi introduzido em cérebros de camundongos recém natos e consecutivamente repassado a cérebros de outros camundongos. O resultado foi a obtenção de uma cepa viral capaz de produzir doença neurológica letal nestes animais (Sabin and Schlesinger, 1945; Cole and Wisseman, 1969). Esta abordagem vem sendo amplamente utilizada como ferramenta para testes de protótipos vacinais anti-dengue (Kaufman et al., 1987; Bray et al., 1989; Falgout et al., 1990; van Der Most et al., 2000; Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011). A vantagem deste modelo consiste na introdução do vírus em um organismo imunocompetente. Entretanto, em detrimento da via de inoculação utilizada, juntamente ao fato de alguns pesquisadores não creditarem a importância das manifestações neurológicas na doença (Patey et al., 1993; Lum et al., 1996), este modelo vem sendo criticado por alguns autores.

1.7.2. Camundongos quiméricos humanizados

Um dos artifícios para tentar obter um modelo animal no qual o vírus é introduzido periféricamente (e não diretamente no sistema nervoso central) é a utilização de camundongos quiméricos humanizados. Camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID, do inglês: *severe combined immunodeficiency*), os quais não possuem células T nem B, não são susceptíveis ao vírus DENV, mas tornaram-se mais permissivos a infecção quando reconstituídos ou transplantados com alguns tipos celulares humanos. Uma pequena fração de camundongos SCID enxertados com linfócitos humanos sanguíneos e posteriormente infectados pela via intraperitoneal com DENV1 albergam a infecção e apresentaram viremia (Wu et al., 1995). Em outro modelo, camundongos SCID foram enxertados com células eritroleucemicas humanas K562 pela via intraperitoneal. Após a introdução da cepa PL046 de DENV2 (vírus isolado de paciente chinês, não adaptado a

camundongos) diretamente na massa tumoral formada nestes animais resultou em presença viral no soro, no tumor e no cérebro dos animais, sendo que estes também exibiram sinais de paralisia e morreram aproximadamente duas semanas após a infecção (Lin et al., 1998). Como o envolvimento hepático é comum nas infecções por DENV em humanos (Seneviratne et al., 2006; Póvoa et al., 2014), camundongos SCID também foram transplantados com células HepG2 (linhagem celular humana de hepatocarcinoma) as quais propagaram no fígado dos recipientes (An et al., 1999). A introdução de DENV2 i.p. nestes animais provocou paralisia entre 13 e 18 dias após a infecção, sendo que neste período os animais apresentaram outras manifestações, tais como trombocitopenia, aumento de hematócrito e aumento de TNF- α no soro, características que recapitulam a forma grave da doença nos humanos. Em outro modelo semelhante, animais SCID foram transplantados com células HuH7, também de origem hepática humana (Blaney et al., 2002). Estes animais SCID-HuH7 quando inoculados com DENV4 apresentaram o vírus detectável no soro, no fígado e no cérebro, sendo este modelo posteriormente também utilizado pra teste de vacinas anti-dengue (Whitehead et al., 2003; Blaney et al., 2005). Animais SCID diabéticos não-obesos (camundongos NOD/SCID) rejeitam menos o transplante de células humanas, pois além de serem deficientes para células T e B, também possuem comprometimento da ação do sistema complemento pela carência de C5 além de serem deficientes de células NK e das funções de apresentação antigênica. Estes animais enxertados com progenitores hematopoiéticos CD34⁺ de cordão umbilical humano se mostraram susceptíveis à infecção com DENV2 pela via sub-cutânea (Bente et al., 2005). Neste caso, a viremia apresentou pico entre 2 e 6 dias depois da infecção e o RNA viral foi detectável no baço, no fígado e na pele de alguns animais.

A abordagem de modelo utilizando camundongos quiméricos humanizados, gera mais esclarecimentos com relação à patogênese. A vantagem no uso desta abordagem é que se pode analisar o comportamento de células humanas frente à ação viral. Entretanto os animais quiméricos são de difícil obtenção, devido à grande variabilidade dos níveis de sucesso no procedimento de enxerto. Esta grande variabilidade acarreta em dados heterogêneos e muitas vezes resultados inconclusivos. Além disso, a

possibilidade de alteração no *crossstalk* entre vários componentes do sistema imune nestes animais quiméricos os tornam pouco apropriados para pesquisas em mecanismos imunológicos da doença (Plummer and Shresta, 2014).

1.7.3. Camundongos imunodeficientes

Animais imunodeficientes apresentam níveis variados de susceptibilidade à infecção com DENV. Camundongos BALB/c atímicos ou deficientes para o gene da recombinase 1 (RAG1^{-/-}), quando infectados pela via parenteral, exibem letalidade de 30 a 60 % (Hotta et al, 1981; Shresta, et al. 2004). Camundongos A/J, que não possuem o componente C5 do sistema complemento, quando infectados com altas doses da cepa DENV2 PL046 apresentam viremia poucos dias após a infecção e trombocitopenia transiente em momentos mais tardios (Huang et al., 2000). Devido à importância do sistema IFN nas infecções virais, animais 129/Sv *knockout* para os receptores de IFN tipo I e II foram avaliados frente à infecção por DENV. Neste caso, 100 % dos animais ficam paráliticos após inoculação i.p. de DENV2 NGC neuroadaptado (Johnson & Roehrig, 1999) ou após infecção i.v. com DENV2 PL046 (Shresta et al, 2004). Nestes estudos o vírus foi detectado no soro, baço e principalmente no cérebro dos animais. Nos modelos de camundongos imunodeficientes supracitados, a morte dos animais é acompanhada de sinais de comprometimento do sistema nervoso central com sintomas de paralisia. Dentre as vias de inoculação utilizadas (i.p. ou i.v) e os tipos de vírus inoculados (adaptado ou não a cérebro de camundongos), observa-se um tropismo para o SNC e seu consequente comprometimento. Na tentativa de estabelecer um modelo animal mais relevante, o vírus PL046 foi adaptado em camundongos e em células de mosquito (C6/36) através de múltiplas passagens alternadas entre os animais e nas culturas celulares (Shresta et al., 2006). O vírus obtido, D2S10, apresentou-se mais virulento levando a morte de animais AG129 entre 3 a 5 dias, sem sinais de paralisia. A infecção com esta cepa gerou alterações de permeabilidade e morte mediada pelo aumento dos níveis de TNF- α , recaptulando, desta forma, parte das manifestações graves da

dengue que ocorre em humanos. Entretanto, a inibição de TNF- α nos animais infectados ainda resultou em paralisia nos animais.

1.8. Modelos em primatas não humanos para o estudo da dengue

Os hospedeiros naturais do vírus DENV são os humanos e os mosquitos. Estudos sorológicos em primatas, na África e no Sudeste da Ásia, sugerem que possa existir um ciclo silvestre em primatas não humanos (NHP, do inglês: *nonhuman primate*) (Wang et al., 2000; Diallo et al., 2003). Chimpanzés, rhesus, bem como outras espécies de macacos, desenvolvem viremia e anticorpos neutralizantes em resposta à infecção subcutânea por DENV (Scherer et al., 1978; Halstead et al., 1973a,1973b,1973c; Halstead and Palumbo, 1973). Porém, as evidências clínicas da doença, como observada em humanos, são escassas nestas espécies. Após injeção do vírus pela via subcutânea em macacos, o DENV se espalha rapidamente para os linfonodos de drenagem e a viremia se inicia entre dois a seis dias depois do inóculo, podendo ser detectado na pele, outros linfonodos, e com baixa frequência, na medula óssea, pulmões, fígado e no timo (Marchette et al., 1973). Em um estudo com infecção em macacos foram observadas leucopenia ou trombocitopenia durante a infecção primária ou secundária com DENV, respectivamente (Halstead et al., 1973a,1973b,1973c; Halstead and Palumbo, 1973). Em outro estudo, foram encontradas outras evidências como petéquia e sangramento subcutâneo, observadas de três a cinco dias após introdução do DENV2 pela via intravenosa (i.v.) (Onlamoon et al., 2010). Embora a hemorragia seja uma característica da manifestação grave da doença em humanos, outras características mais marcantes como o extravazamento de plasma e a febre não se manifestaram nestes animais, o que pode ser visto como uma limitação para estudos que visam a compreensão da patogênese da doença. Por outro lado, o modelo de primatas não humanos é sempre utilizado nos testes finais de vacinas experimentais contra dengue, antes de sua utilização em ensaios clínicos. Nestes modelos, geralmente com rhesus, o principal parâmetro analisado é a redução da viremia nos animais vacinados e desafiados com DENV. Esta redução da viremia

geralmente se correlaciona com os níveis de anticorpos neutralizantes gerados com a vacina em teste.

Diante do exposto, julgamos importante estudar com detalhes a resposta imune no modelo de infecção intracerebral em camundongos BALB/c. Pouco se sabe a respeito da dinâmica da resposta imune primária em animais infectados por esta via, bem como os mecanismos pelos quais uma vacina pode exercer proteção contra a infecção sob tais condições. Neste contexto, o presente estudo objetivou analisar a resposta imune anti-dengue investigando principalmente a participação de subpopulações celulares na imunidade primária e também durante a imunidade adaptativa induzida por vacinas de DNA.

Objetivos

1.9. Objetivo geral

Estudo das respostas imunes primária frente à infecção com DENV2 e adaptativa utilizando vacinas de DNA em um modelo murino.

1.10. Objetivos específicos

- Verificar a participação de subpopulações celulares, a resposta imune humoral e produção de citocinas frente à infecção DENV2 em camundongos BALB/c;
- Avaliar a resposta imune celular induzida por vacinas de DNA que codificam as proteínas NS1, NS3 ou E de DENV2;
- Estudar a resposta imune celular e humoral contra o antígeno NS1 de dengue expresso a partir da vacina de DNA pcTPANS1 em camundongos desafiados com DENV2.

2. Material e métodos

2.1. Vacinas de DNA empregadas no estudo

Neste trabalho, foram utilizadas vacinas de DNA previamente desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV), sendo todas elas com base no plasmídeo comercial pcDNA3. Os plasmídeos vacinais, pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 (Figura 3.1), contém o gene da proteína NS1, NS3 ou a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de DENV2, respectivamente, com a expressão regida pelo promotor de citomegalovírus (CMV). Nos plasmídeos, os genes virais são fusionados à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), o qual direciona a proteína viral expressa para a via exocítica celular. Um plasmídeo contendo apenas a sequência do t-PA (pcTPA) foi utilizado para controlar os experimentos envolvendo as vacinas supracitadas.

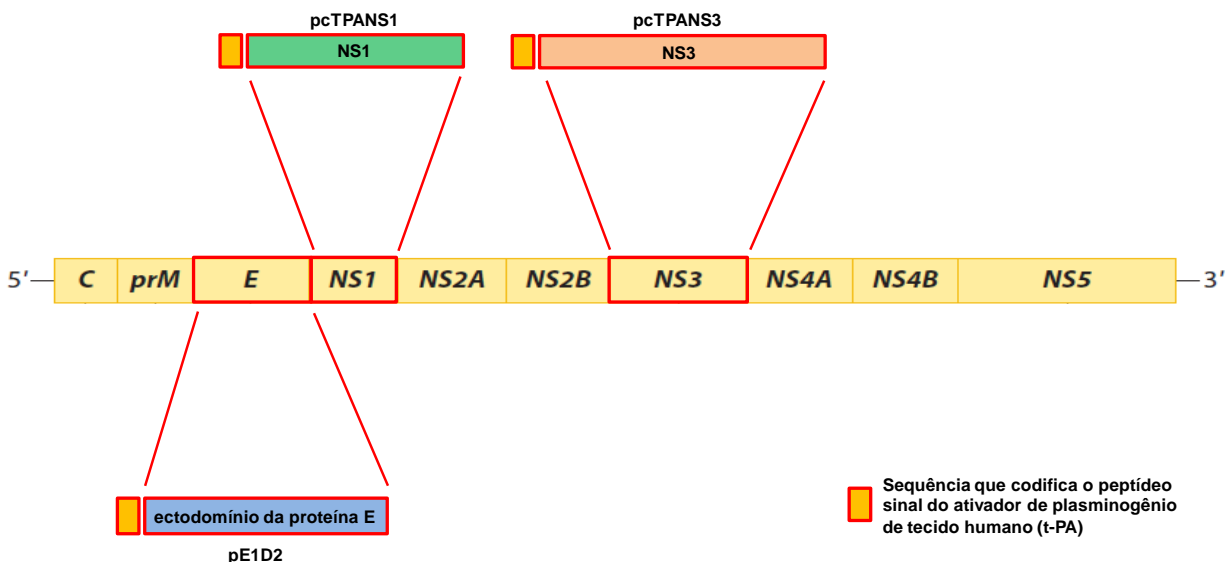


Figura 3.1: Representação esquemática das sequências contidas nos diferentes plasmídeos vacinais. Genoma do vírus DENV exibindo as 10 proteínas virais com destaque para aquelas abordadas neste trabalho. O plasmídeo vetor pcTPA, o qual contém a sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), foi utilizado em todas as construções. Dentre elas: (i) pE1D2, que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E correspondente a 80 % desta proteína (azul), (ii) pcTPANS1, que contém o gene da proteína NS1 (verde) e (iii) pcTPANS3, que contém o gene da proteína NS3 (laranja).

2.2. Produção e purificação das vacinas de DNA

Estoques mantidos em nitrogênio líquido contendo bactérias *Escherichia coli* cepa DH5- α transformadas com o plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3, pE1D2 ou pcTPA foram utilizados para a produção destes plasmídeos. Inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio *Luria-Bertani* (LB) com ampicilina (100 μ g/mL). As culturas foram mantidas sob agitação de 150 rotações por minuto (RPM) a 37 °C por um período de 16 a 18 h. Em seguida, 25 mL desta cultura foi adicionada a 1 L de meio *Terrific Broth* (TB) com ampicilina (100 μ g/mL), contendo 100 mL de uma solução de sais de potássio (KH_2PO_4 0,17 M + K_2HPO_4 0,72 M). O material foi mantido sob as mesmas condições de agitação e temperatura da etapa anterior por 16 a 18 h. Na sequência, o material foi centrifugado a 6000 g por 15 min e os plasmídeos foram

extraídos por lise alcalina e purificados em resina de troca iônica fazendo uso do kit comercial *Qiagen Endofree Plasmid Giga kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Cada coluna do kit foi utilizada para purificar 3 L de cultura bacteriana. Os plasmídeos provenientes do processamento foram ressuspensos em água deionizada livre de endotoxina e armazenados a -20 °C até o momento dos experimentos.

2.3. Quantificação e caracterização das preparações plasmidiais

Os DNAs plasmidiais purificados foram quantificados por espectrofotometria, utilizando aparelho BioPhotometer (Eppendorf). As amostras plasmidiais foram diluídas 1:500 ou 1:1000 e posteriormente a densidade óptica (DO) foi medida sob comprimento de onda de 260 nm para a quantificação dos DNAs. Em seguida, os DNAs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão tris-acetato etileno diaminotetracético (TAE), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transluminador de luz ultravioleta MiniBIS pro (DNR Bio-Imaging Systems) para avaliação da integridade e pureza das preparações. As amostras foram digeridas com enzimas de restrição, no caso dos plasmídeos pcTPA, pcTPANS3 e pE1D2 (Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011; Costa et al., 2011) , com *EcoRV* e *XbaI* e no caso do pcTPANS1 com *EcoRV* e *XhoI*, as mesmas utilizadas para a clonagem dos fragmentos. O processo de digestão procedeu por 1 h a 37 °C em tampão indicado pelo fabricante. O material digerido ou não foi avaliado em gel de agarose 1%, como descrito acima.

2.4. Imunização e desafio

Todos os animais utilizados neste estudo foram BALB/c machos SPF (*specific pathogen free*) com quatro semanas de idade, oriundos do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Campinas, SP. Para a imunização, grupos de animais receberam o inóculo de DNA plasmidial (pcTPANS1, pcTPANS3, pE1D2 ou pcTPA) pela via intramuscular (i.m.) nos quadríceps posteriores, em duas doses separadas por duas semanas. A injeção foi executada com seringa de

insulina e agulha ultrafina 30 G (Becton Dickinson). Em cada dose foram inoculados 100 µg de DNA diluídos em 100 µL de PBS estéril, sendo esta dose dividida em duas injeções de 50 µg (uma em cada pata). 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 L-067/08 e P0104-02).

O vírus empregado nos desafios consiste na linhagem DENV2 Nova Guiné (NGC), adaptado em cérebro de camundongos neonatos. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Dr. Marcos Freire do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), Biomanguinhos, Fiocruz. Duas semanas após a segunda dose vacinal, alguns animais foram desafiados por via intracerebral com DENV2 NGC, inoculados com 30 µL de uma suspensão viral correspondente à 40x uma dose letal de 50% dos animais (40 LD₅₀) e sacrificados em diferentes tempos após a infecção para coleta de amostras. Para a inoculação do vírus e sacrifício, os animais foram anestesiados através de inoculação por via i.m. de 100 µL de uma solução contendo quetamina (15 mg para o desafio e 30 mg para o sacrifício) e xilasina (100 mg para o desafio e 200 mg para o sacrifício).

2.5. Avaliação de morbidade após desafio com DENV

Após o desafio com DENV os animais foram acompanhados por 21 dias para o registro de manifestações de morbidade. Os sintomas computados para esta finalidade foram: (i) alterações na coluna espinhal com conseqüente postura encurvada, (ii) manifestações de paralisia em um ou mais membros locomotores ou (iii) morte.

2.6. Preparação de amostras para análise citométrica

3.6.1. Sangue

O sangue de camundongos BALB/c foi coletado mediante punção intra cardíaca utilizando seringas previamente rinsadas com heparina 5000 UI/mL (Hepamax-S) e

agulhas 26 G x ½ pol. As amostras foram centrifugadas a 700 g por 5 min e o plasma foi transferido para tubos a parte, sendo armazenados a -70 °C para outros ensaios (determinação de citocinas). O sedimento restante foi submetido à lise das hemácias e fixação com paraformaldeído 1%, fazendo uso da solução *FACS Lysing* (BD Biosciences) por 10 min a temperatura ambiente, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 min em PBS pH 7,4 a 700 g por 5 min e ressuspensas em 300 µL de PBS/BSA 1%. As células foram contadas manualmente utilizando hemocitômetro.

3.6.2. Baço

Camundongos BALB/c foram esplenectomizados e os órgãos foram macerados em 10 mL de PBS para desagregação celular. O macerado foi transferido para tubo falcon de 15 mL e mantidos em banho de gelo decantando por 10 min. Após este período, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 700 g por 5 min. As células foram ressuspensas em 5 mL de *FACS Lysing* e mantidas a temperatura ambiente por 10 min. Os esplenócitos foram centrifugados a 700 g por 5 min, ressuspensos em 1 mL de PBS/BSA 1% e contadas manualmente em hemocitômetro.

3.6.3. Linfonodo

Os linfonodos eleitos para estudos em citometria foram os linfonodos poplíteos devido a sua proximidade com o sítio de aplicação das vacinas de DNA. Estes linfonodos foram removidos e macerados em PBS pH 7,4. O material foi centrifugado a 700 g por 10 min, ressuspensos em 5 mL de *FACS Lysing* e mantido a temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 700 g por 5 min e ressuspensas em 300 µL de PBS/BSA 1% e contadas manualmente em hemocitômetro.

3.6.4. Fígado

As células mononucleares do fígado dos camundongos estudados foram isoladas pelo gradiente de densidade de ficoll utilizando o reagente Histopaque® (Sigma). O fígado removido dos animais foi macerado em 5 mL de RPMI incompleto. A suspensão celular resultante foi lentamente adicionada em tubos contendo 5 mL de Histopaque® sendo evidenciada a formação de duas fases (Ficoll e amostra). Os tubos foram centrifugados a 800 g por 30 min a temperatura ambiente. O anel compreendido na interface ficoll/fase aquosa, contendo as células mononucleares, foi transferido cuidadosamente para novos tubos e as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4. As células foram ressuspensas em 5 mL de *FACS Lysing* e mantidas a temperatura ambiente por 10 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 700 g por 5 min e ressuspensas em 150 µL de PBS/BSA 1% e contadas manualmente em hemocitômetro.

3.6.5. Cérebro

O isolamento de células mononucleares presentes nas amostras de cérebro foi feito mediante gradiente de percoll e ficoll. O cérebro dos animais foram macerados em 5 mL de RPMI e adicionado cuidadosamente em um tubo previamente preparado contendo 10 mL de RPMI, 9 mL de percoll e 1 mL de PBS 10x. As amostras foram centrifugadas a 7800 g por 30 min a temperatura ambiente. Os leucócitos separados pelo gradiente foram transferidos para um novo tubo e lavados com RPMI a 800 g por 10 min. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio e esta suspensão celular foi lentamente adicionada em tubo contendo 5 mL de Histopaque®. Os tubos foram centrifugados a 800 g por 30 min a temperatura ambiente. O anel compreendido na interface ficoll/fase aquosa, que contém as células mononucleares, foi transferido cuidadosamente para novos tubos e lavados duas vezes com PBS pH 7,4. As células foram ressuspensas em 5 mL de *FACS Lysing* e mantidas a temperatura ambiente por 10 min. Por fim, as amostras foram lavadas, conforme descrito anteriormente, e

ressuspensas em 150 μ L de PBS/BSA 1% e contadas manualmente em hemocitômetro.

3.6.6. Medula óssea

Para o isolamento das células medulares, os fêmures de camundongos BALB/c foram dissecados e em seguida a extremidade anterior e posterior foram removidas mecanicamente. As células medulares foram recolhidas em tubos mediante lavagem intramedular com PBS, agulha (26 G) e seringa. O material foi centrifugado a 700 g por 10 min, ressuspensão em 5 mL de *FACS Lysing* e mantido a temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 700 g por 5 min e ressuspensas em 300 μ L de PBS/BSA 1% e contadas manualmente em hemocitômetro.

2.7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Aproximadamente 10^6 células isoladas após processamento para análise citométrica foram utilizadas para marcação com anticorpos de superfície. Todos os anticorpos utilizados foram provenientes da BD biosciences®. As células foram submetidas à centrifugação a 700 g por 10 min e o sedimento foi incubado com anticorpos monoclonais anti-camundongo (Tabela 3.1), previamente titulados, por 20 min em banho de gelo. As amostras foram lavadas com PBS pH 7,4 nas mesmas condições de centrifugação acima para remoção da fração não ligada de anticorpos. O material foi ressuspensão em volume de 300 μ L e analisados em aparelhos de citometria: Accuri (BD Accuri C6); FACSCalibur (BD); Cyan ADP Analyser (Dako); ou FACS Canto II (BD). Para amostras de sangue e baço foram coletados 20000 eventos na região de linfócitos e para os outros sítios de análise (fígado, medula óssea, linfonodo e cérebro) foram coletados de 5000 a 10000 eventos. Os arquivos gerados foram analisados *offline* utilizando os softwares: FlowJo 10 (treestar); Cflow (Dako); ou Summit 4.1 (Dako). Para o controle das marcações, foram feitas incubações com anticorpos isotipos dos anticorpos monoclonais conjugados ao mesmo fluoróforo

(indicados pelo fabricante) e na mesma diluição dos anticorpos de análise empregados nos testes. Em algumas amostras de sangue, onde foram feitas determinações por valores absolutos, dados de leucometria foram levados em consideração. Neste caso, 20 µl de sangue total dos camungondos analisados, foram diluídos em 100 µl de *FACS Lysing* e posteriormente aferidos em hemocítômetro para a determinação da concentração de leucócitos na amostra. Em seguida, o número absoluto de eventos para cada fenótipo subpopulacional foi calculado com base nos percentuais obtidos nas análises cimométricas *offline*.

Tabela 3.1: Relação dos anticorpos empregados nos ensaios de imunofenotipagem

Reagente	Fuorocromo	Diluição
Anti-CD3	PE	1:50
	PerCP	1:100
	Alexa Fluor® 700	1:50
Anti-CD4	FITC	1:100
	PE	1:100
	PerCP	1:100
	APC	1:400
Anti-CD8	PerCP	1:25
	APC	1:100
Anti-B220	APC	1:400
Anti-IgD	FITC	1:100
Anti-CD45RB	FITC	1:200
Anti-CD44	PE	1:50
Anti-CD69	PECy7	1:100
Anti-CD62L	PECy7	1:100
Anti-CD19	PECy7	1:100
Anti-CD11c	PE	1:50
Anti-CD49b	FITC	1:100

Legenda: FITC - isotiocianato de fluoresceína; PE - ficoeritrina; PerCP - clorofila peridina; APC - alofocianina; Cy7 - cianina.

2.8. Ensaio de ELISA

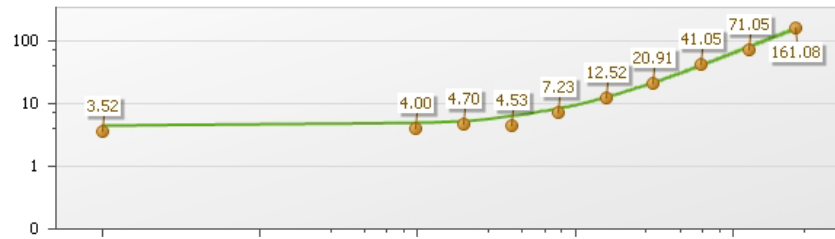
Como antígeno de fase sólida para os ensaios de ELISA foi utilizado a proteína NS1 recombinante expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*). Esta proteína foi purificada e submetida a um tratamento para o seu re-novelamento, levando a formação de dímeros (Amorim *et.al.* 2010) e foi gentilmente cedida pelo Dr. Luis Carlos Ferreira do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo. 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 ou anti-IgM total de camundongo) conjugado a peroxidase (*Southern Biotechnology*), na diluição de 1:4000 para anti-IgG e 1:6000 para anti-IgM em PBS. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS TWEEN 0,05 % e as mesmas 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), ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 9 N, e as densidades óticas foram lidas com filtro de 490 nm no leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices).

2.9. Determinação de citocinas

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 FCAP array 3.0 BD[®]. O modelo logístico de cinco parâmetros (Gottschalk & Dunn, 2005) foi empregado para a determinação da concentração dos analitos. Um pool de citocinas padrão foram diluídas em série para a construção de curvas de calibração. Os valores de mediana de intensidade de fluorescência dos complexos microesferas-analitos presentes em cada diluição, os quais são diretamente proporcionais à quantidade de citocina padrão, foram utilizados para correlacionar com a concentração em pg/mL. O limite de detecção de cada analito corresponde a: 5,0 pg/ml para IL-6; 17,5 pg/ml para IL-10; 52,7 pg/ml para MCP-1; 2,5 pg/ml para IFN- γ ; 7,3 pg/ml para TNF- α ; e 10,7 pg/ml para IL-12p70. O coeficiente de correlação obtido para as curvas padrão foi de no mínimo 99,71% (Figura 3.2).

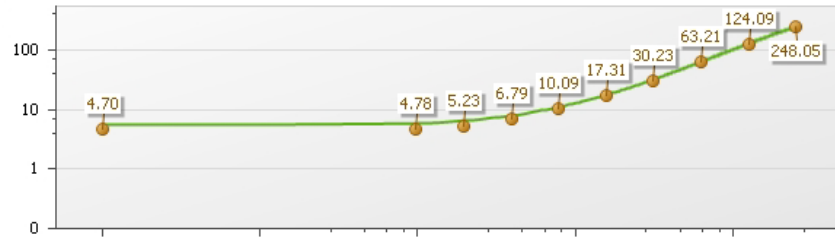
MFI (anticorpo de detecção)



Microesfera 1

IL-12p70

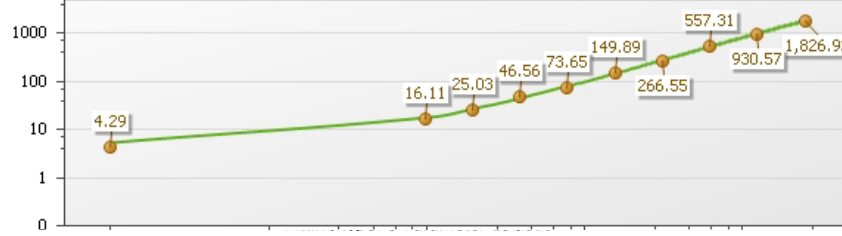
$R^2 = 99,71\%$



Microesfera 2

TNF- α

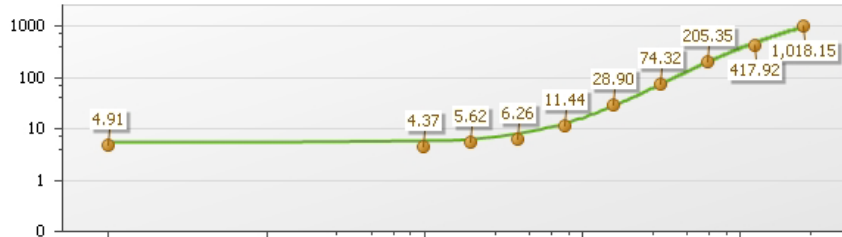
$R^2 = 99,96\%$



Microesfera 3

IFN- γ

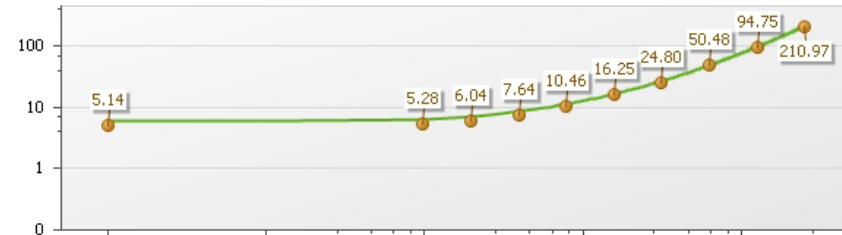
$R^2 = 99,95\%$



Microesfera 4

MCP-1

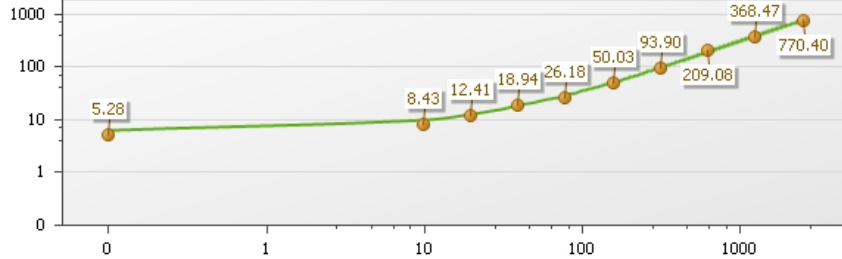
$R^2 = 99,84\%$



Microesfera 5

IL-10

$R^2 = 99,93\%$



Microesfera 6

IL-6

$R^2 = 99,89\%$

pg/mL

Figura 3.2. Curvas de calibração para a determinação de citocinas. A pesquisa de citocinas em amostras de plasma proveniente dos animais infectados ao longo da cinética se deu mediante técnica de *cytometric bead array* (CBA). Um pool de citocinas padrão foram diluídas em série para a construção das curvas de calibração. Os dados de mediana de intensidade de fluorescência das diluições, os quais são diretamente proporcionais a quantidade de citocina padrão, foram utilizados para correlacionar com a concentração em pg/mL. O modelo logístico de cinco parâmetros foi aplicado para a regressão dos dados. Curvas de calibração para cada citocina analisada exibindo o coeficiente de correlação.

Para níveis de citocinas indetectáveis ou não-extrapoláveis pelo modelo matemático aplicado, utilizamos uma abordagem de comparação qualitativa com base no aumento percentual da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do anticorpo de detecção medido nas amostras, utilizando o branco (diluído pelo kit comercial) como referência. Para isso, foi utilizada a seguinte transformação:

$$\text{Aumento de MFI \%} = 1 - (\text{MFI}_{\text{amostra}}/\text{MFI}_{\text{branco}}) \times 100$$

2.10. Enriquecimento de células T e marcação com CFSE para ensaios de transferência

Para os ensaios de transferência de células, foi realizado sacrifício de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 (n=13 por grupo) para obtenção dos baços, que foram dissecados assepticamente e macerados com 5 mL de meio RPMI-1640 (SIGMA), e de soro. Após maceração as células foram transferidas para tubos contendo 30 mL de meio RPMI e sedimentadas por 10 minutos para remoção dos agregados maiores. O sobrenadante (constituído por esplenócitos) foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 minutos a 700 g, 4 °C. O sedimento 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 completo, pH 7,4 a 37°C. O eluído foi centrifugado conforme acima, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 3x10⁷ células/mL. Para avaliar o procedimento de enriquecimento, foram coletadas alíquotas antes e depois da passagem dos esplenócitos nas colunas de lã de nylon, sendo estas

marcadas com anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC e anti-CD8-PerCP conjuntamente (vide item 3.4).

Cerca de 3×10^8 células de baços de camundongos imunizados ou não foram incubados com $8,5 \mu\text{M}$ de 5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster, (Molecular Probes, CFSE) em PBS, por 15 minutos a 37°C . Após esta incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI sem soro fetal bovino, ajustando a concentração para aproximadamente 2×10^7 células/ $100 \mu\text{L}$, sendo uma alíquota separada para avaliação com os marcadores anti-CD4 e anti-CD8. Um volume de $100 \mu\text{L}$ foi injetado pela veia do plexo retro orbital em outros camundongos BALB/c, os quais se encontravam no quarto dia após o desafio com DENV2 pela via i.c. Dessa forma, um grupo de animais ($n=6$) recebeu a suspensão enriquecida de células T proveniente dos animais vacinados com pcTPANS1 e marcada com CFSE, e outro grupo ($n=6$) recebeu a suspensão enriquecida de células T proveniente dos animais não vacinados e marcada com CFSE. Neste momento, cada animal recebeu também 1 mL de soro (proveniente de animais vacinados ou não) pela via i.p. Após período de três dias, os animais recipientes foram sacrificados e o baço, sangue, fígado, cérebro e medula óssea femural foram processados para análise citométrica (vide tópico 3.6). As células extraídas foram combinadas em *pools* individuais de cada sítio de análise e adicionalmente marcadas com anti-CD4 e anti-CD8 (como no item 3.7) e foram analisadas em aparelho FACS Canto II (BD). Cerca de 50000 eventos foram contados na região de linfócitos para as amostras de baço, sangue e medula, e aproximadamente 10000 eventos foram coletados nesta mesma região para as amostras de cérebro e fígado. Este experimento está representado na Figura 3.3.

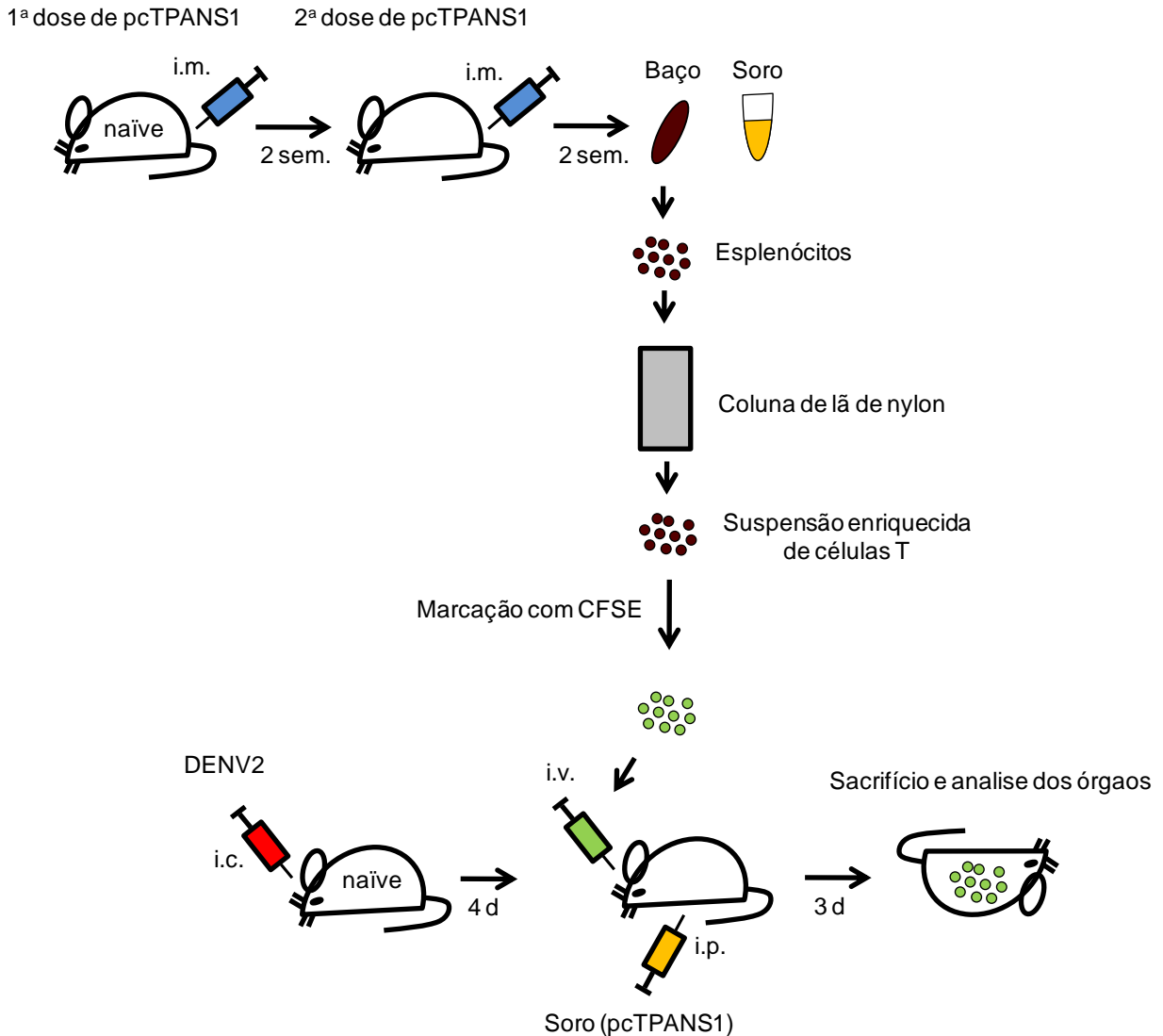


Figura 3.3. Representação do procedimento de enriquecimento de células T, marcação com CFSE e transferência de células para camundongos BALB/c desafiados com DENV. Camundongos BALB/c (n=13) foram imunizados com duas doses de pcTPANS1 pela via i.m. e duas semanas após a última inoculação foram extraídos o baço e o soro destes animais. Os esplenócitos foram isolados e submetidos ao procedimento de enriquecimento de células T mediante passagem por coluna de lã de nylon. Após esta etapa, as células foram marcadas com CFSE, transferidas por via i.v. para recipientes BALB/c (n=6), os quais se encontravam no quarto dia de infecção com DENV2 pela via i.c. Os animais recipientes também receberam 1 mL de soro proveniente dos animais vacinados. Após o período de 3 dias, os animais foram sacrificados e as amostras de baço, sangue, cérebro, fígado e medula óssea femoral foram coletadas e processadas para avaliação citométrica. Para o controle experimental, o mesmo procedimento foi executado com o isolamento, enriquecimento e marcação com CFSE de esplenócitos provenientes de animais (n=13) não vacinados e transferidos para animais desafiados (n=6).

2.11. Tratamento estatístico dos dados

As distribuições de sobrevivência Kaplan-Meier foram avaliadas mediante o método de Log-Rank e o teste de Mantel-Haenszel foi utilizado para a determinação da taxa de risco, utilizando o programa GraphPad Prism v3.1. Para a determinação de citocinas pelo método CBA foi utilizado o modelo logístico de cinco parâmetros com uso do programa FCAParray 3.0 (BD). As diferenças dos níveis de citocinas e determinações citométricas foram avaliadas utilizando o método não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v3.1, com nível de significância mínimo de 95%.

3. Resultados

3.1. Resposta imune primária após inoculação de DENV por via intracerebral em camundongos BALB/c

Nesta primeira etapa do estudo, o objetivo maior resumiu-se em investigar os sinais clínicos e a resposta imune primária no modelo murino de infecção por DENV com animais imunocompetentes, no qual se utiliza camundongos BALB/c SPF infectados por via intracerebral (i.c.) com DENV2 neuroadaptado. Este modelo animal é amplamente empregado em estudos de eficácia de vários protótipos vacinais, entretanto, a proteção contra a infecção, em geral, é basicamente medida pela ocorrência ou não de letalidade nos camundongos infectados. Dessa forma, para esta análise foi realizada imunofenotipagem das populações celulares envolvidas, bem como a pesquisa de seus produtos, como imunoglobulinas e citocinas presentes no sangue destes animais.

4.1.1 Heterogeneidade da morbidade no modelo de infecção com DENV2

Avaliamos inicialmente, sinais de morbidade induzidos em animais BALB/c após a inoculação por via i.c. com DENV2. Neste modelo, os sinais clínicos da infecção surgem a partir do sétimo dia de infecção. Utilizando dose de 40 LD₅₀ do vírus DENV2 NGC, 90 % dos animais morreram ao longo de 21 dias após a infecção, dos quais 54,7 % após manifestação de comprometimento do SNC, tais como paralisia de membros inferiores e alterações da coluna cervical, e 35,3 % sucumbiu à infecção sem qualquer manifestação aparente de comprometimento do SNC 16 h antes da morte. O restante dos animais (10 %) sobreviveu sem sintomas (Figura 4.1 A). Na análise de comparação das distribuições de sobrevivência Kaplan-Meier, o valor de p, calculado pelo teste de Log-Rank, entre as curvas *mock* e 40 LD₅₀ foi menor que 0,0001. Em seguida, para verificar o risco de morte relacionado ou não ao surgimento de morbidades, analisamos curvas de sobrevivência nas quais foram computadas apenas as mortes com ou sem

manifestações dos sinais clínicos após infecção. O método de Mantel-Haenszel foi utilizado para a determinação da taxa de risco entre essas distribuições, utilizando o grupo *mock* como referência. As taxas de risco foram de 4,99 e 6,19 para as curvas analisadas sem sintomas aparentes e com sintomas, respectivamente. Observamos também que os eventos de morte sem sintomas aparentes aconteceram do 7º ao 10º dia após a infecção, enquanto que aquelas com manifestação de comprometimento do SNC se estenderam do 8º ao 15º dia a partir do dia do inóculo viral (Figura 4.1 B). Em conjunto, estes dados indicam que embora exista um importante componente fatal neste modelo envolvendo manifestações de morbidades relacionadas à disfunção do SNC, a letalidade é também relevante em animais que não manifestaram estas características clínicas. Isto descreve uma distribuição heterogênea da morbidade no modelo de infecção abordado.

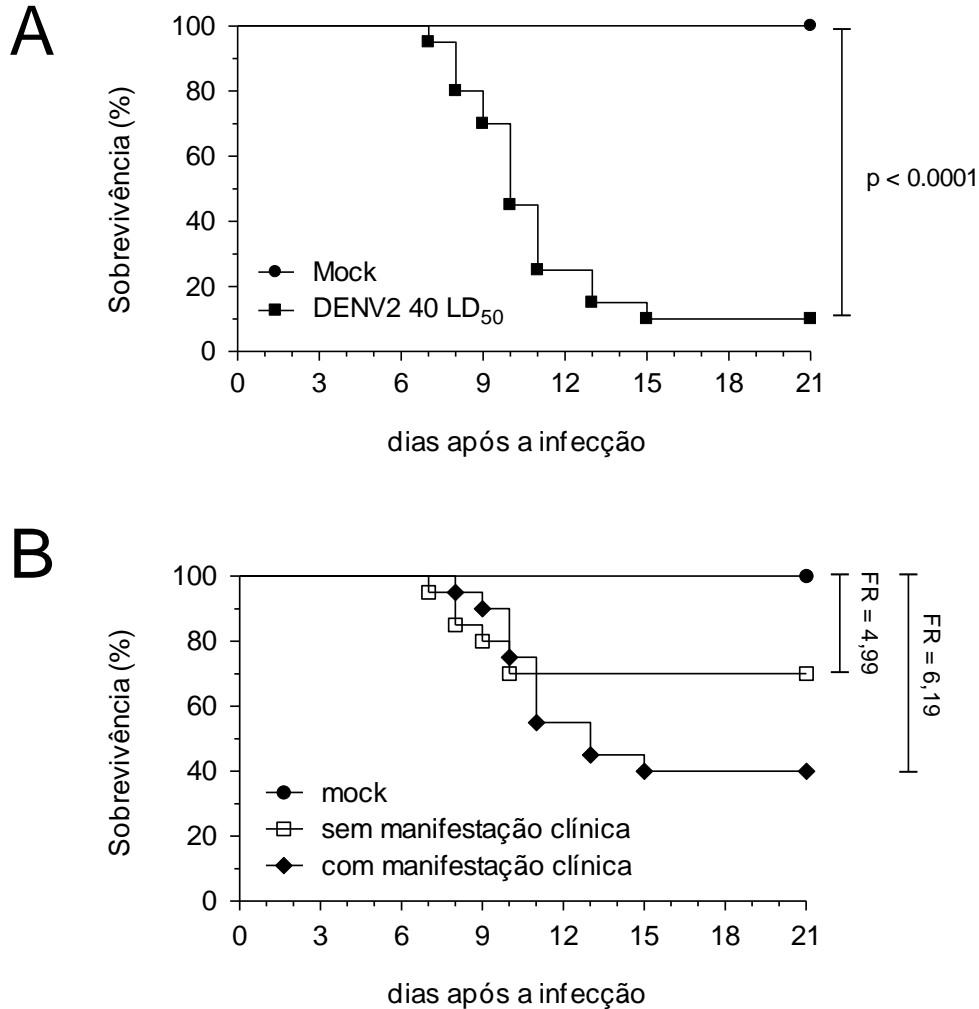


Figura 4.1 Suscetibilidade de animais BALB/c à infecção primária com DENV2 por via intracerebral. Animais BALB/c ($n = 20$) foram inoculados pela via intracerebral (i.c.) com DENV2 NGC neuroadaptado 40 LD₅₀ propagado em cultura de células Vero. O grupo controle (Mock, $n = 10$) é representado pelos animais que receberam sobrenadante da cultura de células não infectadas, também por via i.c. Os animais foram acompanhados por 21 dias para a determinação da curva de sobrevivência (**A**). Curvas de sobrevivências foram construídas considerando apenas as mortes com ou sem manifestação sintomática relacionada ao comprometimento do SNC (paralisias ou alterações da coluna cervical) observados até 16 h antecedentes à morte dos animais (**B**). As distribuições de Kaplan-Meier foram comparadas utilizando teste de Log-rank e o fator de risco (FR) foi calculado utilizando método de Mantel-Haenszel. As curvas representadas são referentes à combinação de três experimentos independentes.

4.1.2 Células T esplênicas e sanguíneas participam na resposta ao DENV inoculado por via intracerebral

O efeito da infecção viral na ativação de linfócitos T foi avaliado por citometria de fluxo com base na diminuição da expressão do CD45RB, que é uma proteína tirosinofosfatase transmembranar expressa em leucócitos. Em camundongos, após estímulo antigênico, a medida em que ocorre ativação da célula T direcionando-a para um fenótipo de célula efetora, a expressão de CD45RB é reduzida na sua superfície. Tanto o sangue quanto o baço foram coletados em estudo de cinética da infecção no modelo abordado. As amostras foram processadas e preparadas para análise fenotípica considerando conjuntamente os seguintes marcadores: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD45RB. A Figura 4.2 mostra a estratégia de análise e o aspecto geral das amostras em termos morfológicos e de evidenciações populacionais com os marcadores relatados em uma amostra representativa do sangue de um animal controle e infectado. Percebemos que a expressão constitutiva de CD45RB na superfície de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ é diferenciada. De modo geral, nos camundongos não infectados, detectamos que os linfócitos TCD8⁺ expressam, por natureza, aproximadamente 10 vezes mais CD45RB (determinação baseada na mediana da intensidade de fluorescência) na sua superfície em relação aos linfócitos TCD4⁺. Portanto para estudar a ativação destas células baseada neste marcador, delimitamos uma região CD45RB^{low} para os eventos compreendidos em cada uma dessas populações, TCD4⁺ e TCD8⁺.

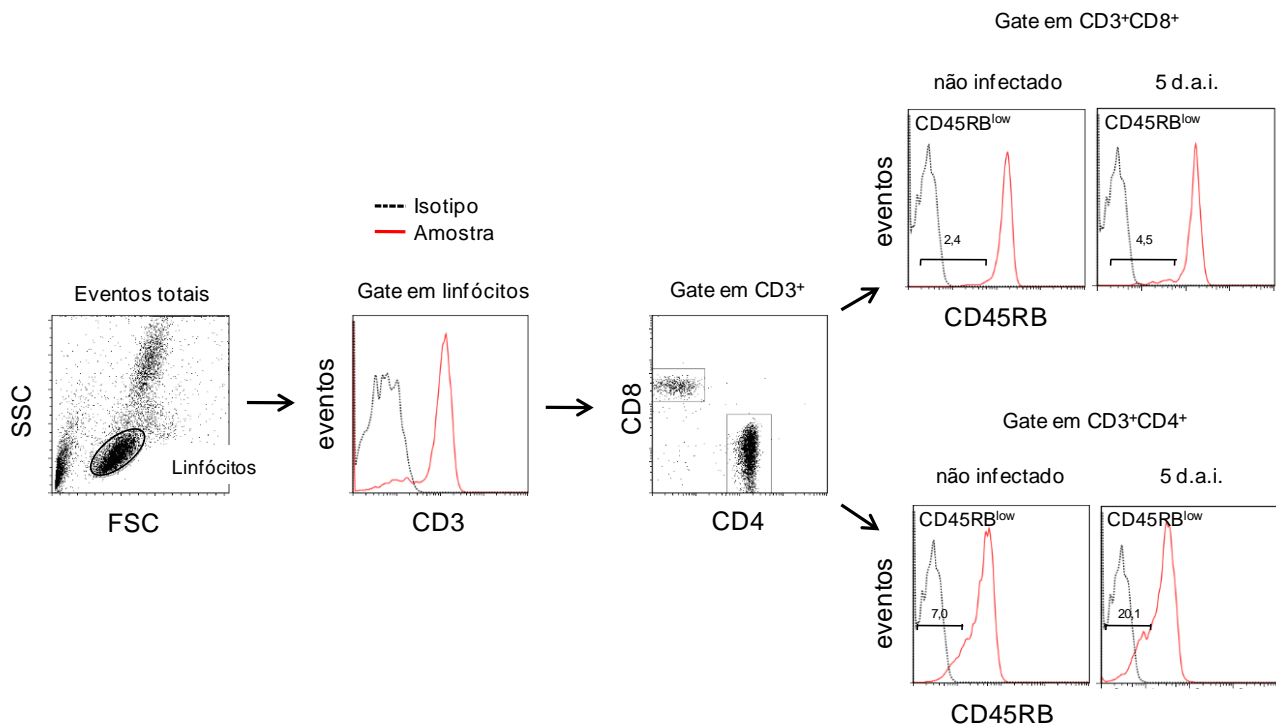
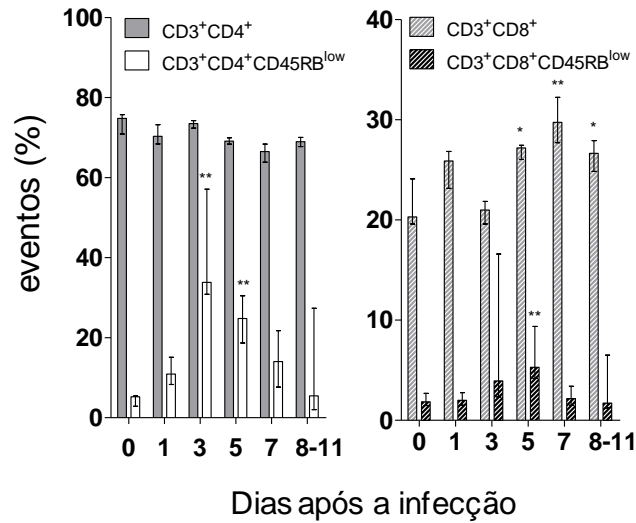


Figura 4.2. Estratégia de análise da ativação de células T baseada na regulação da expressão de CD45RB. A figura é representativa de uma amostra do sangue exibindo a estratégia de análise adotada para o estudo das células T ativadas. Região de análise (considerada como região de linfócitos) foi definida no gráfico de dispersão de pontos sob os parâmetros morfológicos de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC). A partir daí, a expressão de CD4 e CD8 foi avaliada nos eventos positivos para CD3. Uma região CD45RB^{low} foi definida para cada população de células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺, posicionada no limite interior da intensidade de fluorescência do marcador. Amostras de sangue representativas de um animal controle não infectado e cinco dias após a infecção (d.a.i.). Valores sobre os marcadores representam percentuais. Linha vermelha – expressão do marcador indicado; linha preta pontilhada – isotipo controle.

Tanto no baço quanto no sangue, não detectamos variações significativas nas quantidades das populações de células CD3⁺CD4⁺ nos grupos de animais analisados nos diferentes pontos. Os percentuais esplênicos de CD3⁺CD8⁺ aumentaram progressivamente a partir do terceiro dia e se mantiveram elevados até os últimos dias da avaliação da cinética (8 a 11 dias), enquanto que no sangue observamos um platô do percentual máximo destas células a partir do quinto dia de infecção, ambas quando comparadas ao grupo não infectado. Quanto à investigação segundo a expressão reduzida de CD45RB em células T, foi revelada uma redução dessa molécula na superfície de membrana dos linfócitos T, tanto no baço quanto no sangue, em relação aos controles. No baço, observamos que a curva de expressão cinética da subpopulação CD3⁺CD4⁺CD45RB^{low} atingiu um pico no terceiro dia após a infecção, e no quinto dia o mesmo ocorreu para a subpopulação CD3⁺CD8⁺CD45RB^{low}. Em seguida, observamos uma redução progressiva até os pontos finais do estudo (Figura 4.3 A). No sangue, o percentual do fenótipo CD3⁺CD4⁺CD45RB^{low} aumentou do primeiro ao sétimo dia de infecção e reduziu nos pontos finais, enquanto que o fenótipo CD3⁺CD8⁺CD45RB^{low} apresentando aumento significativo apenas no quinto dia da cinética. De uma forma geral, estes valores percentuais corroboraram com as contagens de valores absolutos para estes fenótipos (Figura 4.3 B). As comparações foram feitas levando em consideração o ponto zero da cinética que é referente ao grupo de animais não infectados. Valores referentes ao grupo *mock* (no ponto de 5 dias após o inóculo) não diferiram significativamente do ponto zero da cinética para os fenótipos estudados. Em conjunto, estes dados mostram a participação da resposta de linfócitos T esplênicos e sanguíneos no modelo abordado, sendo importante ressaltar que, de uma forma geral, a ativação de células T antecedeu ao surgimento das morbidades, as quais quando observadas se iniciam a partir do sétimo dia após a infecção.

A

Baço



B

Sangue

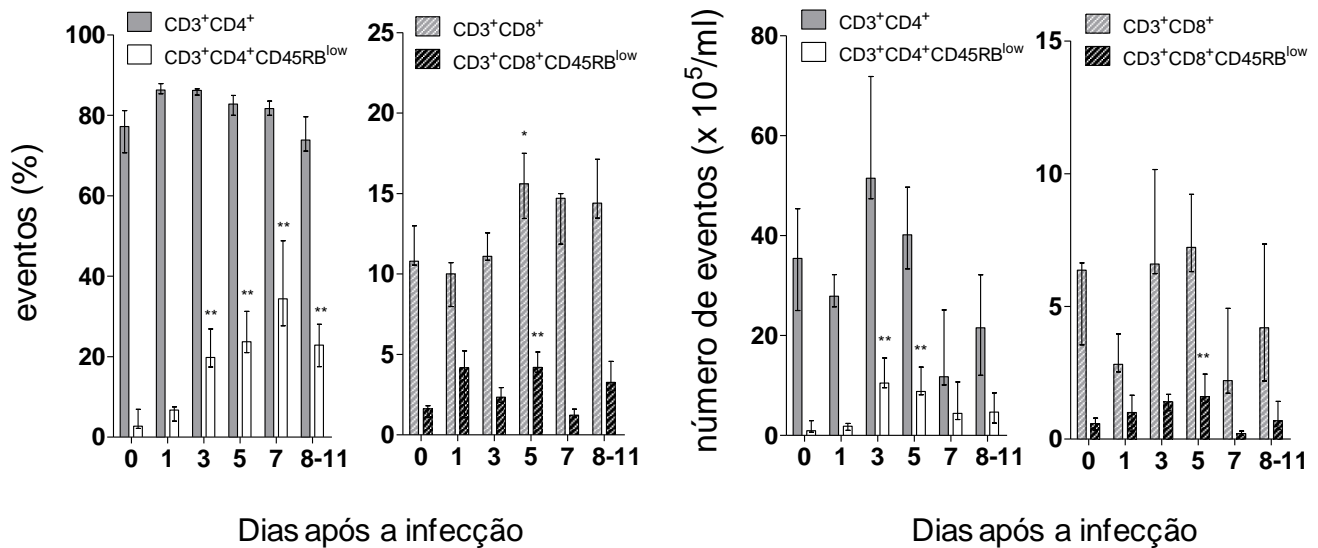
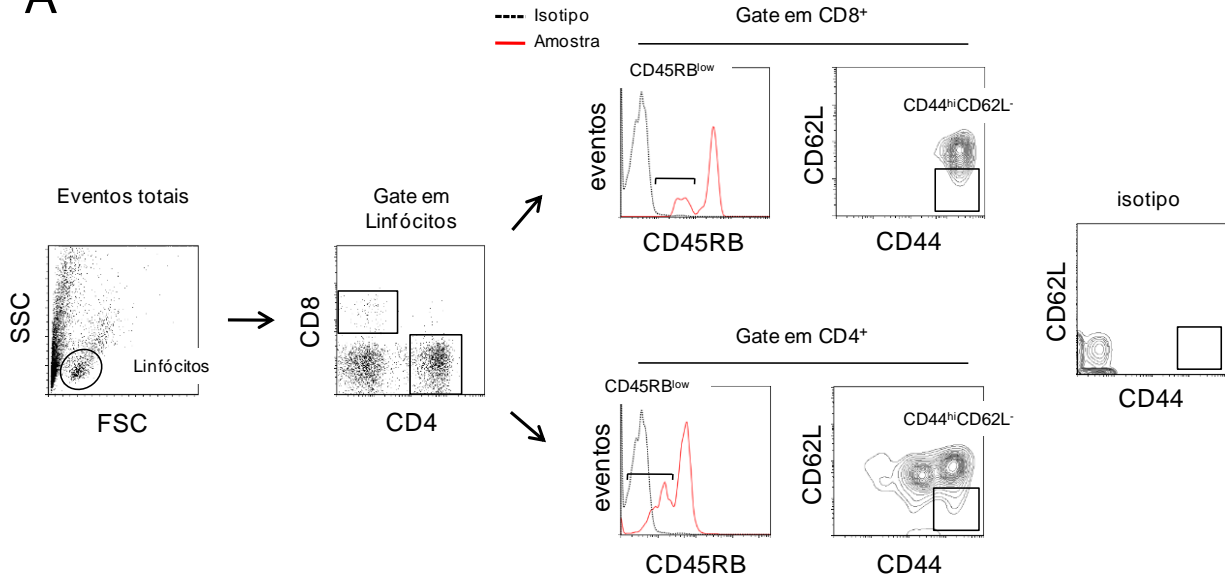


Figura 4.3. Ativação de células T na infecção primária por DENV segundo expressão de CD45RB. Análise das variações percentuais das populações de células T após infecção com DENV2 NGC pela via i.c. em animais BALB/c. A figura mostra a mediana dos percentuais de eventos com intervalos interquartis para os fenótipos de células TCD4⁺, TCD8⁺ ou ambas ativadas mediante expressão reduzida de CD45RB observadas no baço (A) e no sangue (B), neste último caso, sendo também exibida a análise por valores absolutos. Os dados são representativos de três experimentos independentes (n maior ou igual 5 animais por grupo). Asterísticos representam diferença significativa quando comparado ao ponto zero da cinética (grupo de animais não infectados) utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05; **p < 0,01).

4.1.3 Resposta de células T efetoras no tecido hepático dos animais infectados com DENV

Com o intuito de verificar a atividade efetora de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no tecido periférico dos animais infectados, elegemos o fígado como órgão alvo de estudo devido ao seu envolvimento na patogênese da dengue. Neste experimento consideramos apenas os pontos 0, 3 e 8-11 dias após a infecção. Linfócitos provenientes do tecido hepático foram imunofenotipados por citometria de fluxo considerando os seguintes marcadores: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB, anti-CD44 e anti-CD62L. Nesta abordagem analítica, os marcadores CD44 e CD62L foram utilizados para a definição do fenótipo de célula efetora, que consideramos como os linfócitos CD44^{hi}CD62L⁻. A Figura 4.4 A mostra a estratégia de análise citométrica bem como os perfis dos marcadores indicados nas células isoladas do órgão. A variação dos percentuais de células CD4⁺ observada ao longo da cinética, não foi estatisticamente significativa, entretanto identificamos um aumento do percentual de células CD8⁺ nos pontos entre 8 e 11 dias após a infecção em relação ao controle. Percentuais das subpopulações de células com os fenótipos CD4⁺CD45RB^{low} e CD4⁺CD44^{hi}CD62L⁻ aumentaram em relação ao controle nos pontos finais da cinética (8 a 11 dias). Neste mesmo período, observamos também uma maior presença de células CD8⁺CD45RB^{low}, enquanto que o fenótipo CD8⁺CD44^{hi}CD62L⁻ mostrou-se aumentado já a partir do terceiro dia após a infecção (Figura 4.4 B). Dessa forma, sugerimos que neste modelo animal, existe a participação de resposta de células T efetoras em tecidos periféricos que também são afetados.

A



B

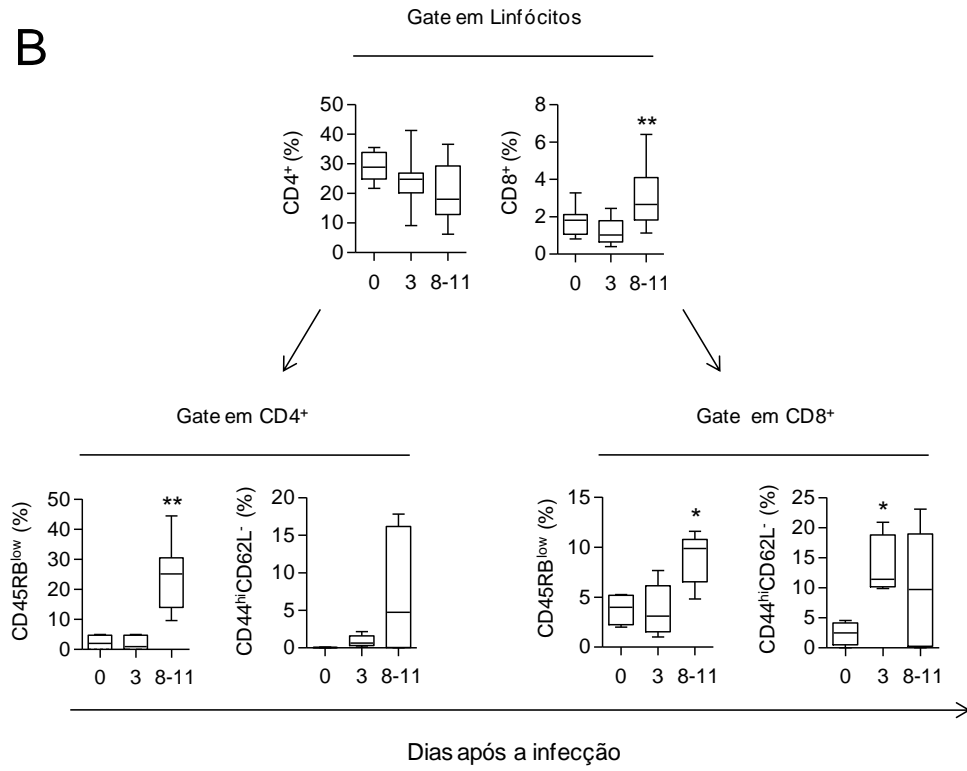


Figura 4.4. Resposta de células T efetoras no fígado de animais infectados com DENV. Animais BALB/c (n=5 por grupo) inoculados com DENV2 pela via i.c. foram avaliados em diferentes pontos quanto à resposta efetora de células T presentes no tecido hepático. **(A)** Amostra representativa proveniente de um animal sacrificado no período de 8 a 11 dias após a infecção, na qual se exibe a estratégia de análise citométrica evidenciando as subpopulações de células T a partir de uma região de linfócitos. Os fenótipos CD45RB^{low} e CD44^{hi}CD62L⁻ foram investigados considerando eventos presentes nas regiões tanto de CD4⁺ quanto de CD8⁺. **(B)** Determinação quantitativa dos percentuais fenotípicos abordados com valores expressos em mediana, intervalos interquartis e limites superior e inferior. Asterísticos representam diferença significativa quando comparado ao grupo ponto inicial da cinética utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05; **p < 0,01). Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.1.4 Animais infectados exibindo comprometimento do SNC apresentam infiltrado cerebral linfocitário com predominância de células CD4⁺

Uma vez que a sintomatologia principal do modelo abordado se baseia no surgimento de paralisias e comprometimento da coluna cervical após a infecção, objetivamos investigar o cérebro destes animais quanto à presença de infiltrado linfocitário. Para tal finalidade, os linfócitos foram isolados por gradiente de densidade e, para avaliar a aplicabilidade deste método, um cérebro de camundongo não infectado foi macerado junto com uma porção de esplenócitos do próprio animal (resultante do baço macerado em RPMI) (amostra Spike). Amostras de cérebro foram coletadas dos animais no terceiro dia e nos pontos entre 8-11 dias após a infecção de acordo com o surgimento de morbidades relacionadas à disfunção do SNC e processadas para fenotipagem citométrica considerando os marcadores anti-CD4 e anti-CD8. O procedimento empregado para isolamento de linfócitos mostrou-se eficaz, pois na amostra Spike foi possível visualizar, citometricamente, as células esplênicas contaminantes sob parâmetros condizentes com morfologia linfocitária (Figura 4.5 A). Não observamos infiltrados linfocitários nas amostras dos animais inoculados com *mock* ou nas amostras coletadas três dias a partir da infecção. Já nos cérebros coletados nos pontos entre 8 e 11 dias a partir da infecção, quando evidenciamos sintomas de comprometimento do SNC, identificamos a presença de infiltrado linfocitário com predominância de células CD4⁺ (62,5 % \pm 15,7), enquanto que as células CD8⁺ representaram uma média percentual de 24 \pm 9,5 (Figura 4.5 A e B). Estas observações sugerem uma migração linfocitária induzida pela infecção com DENV2 o que implica no comprometimento da barreira hematoencefálica.

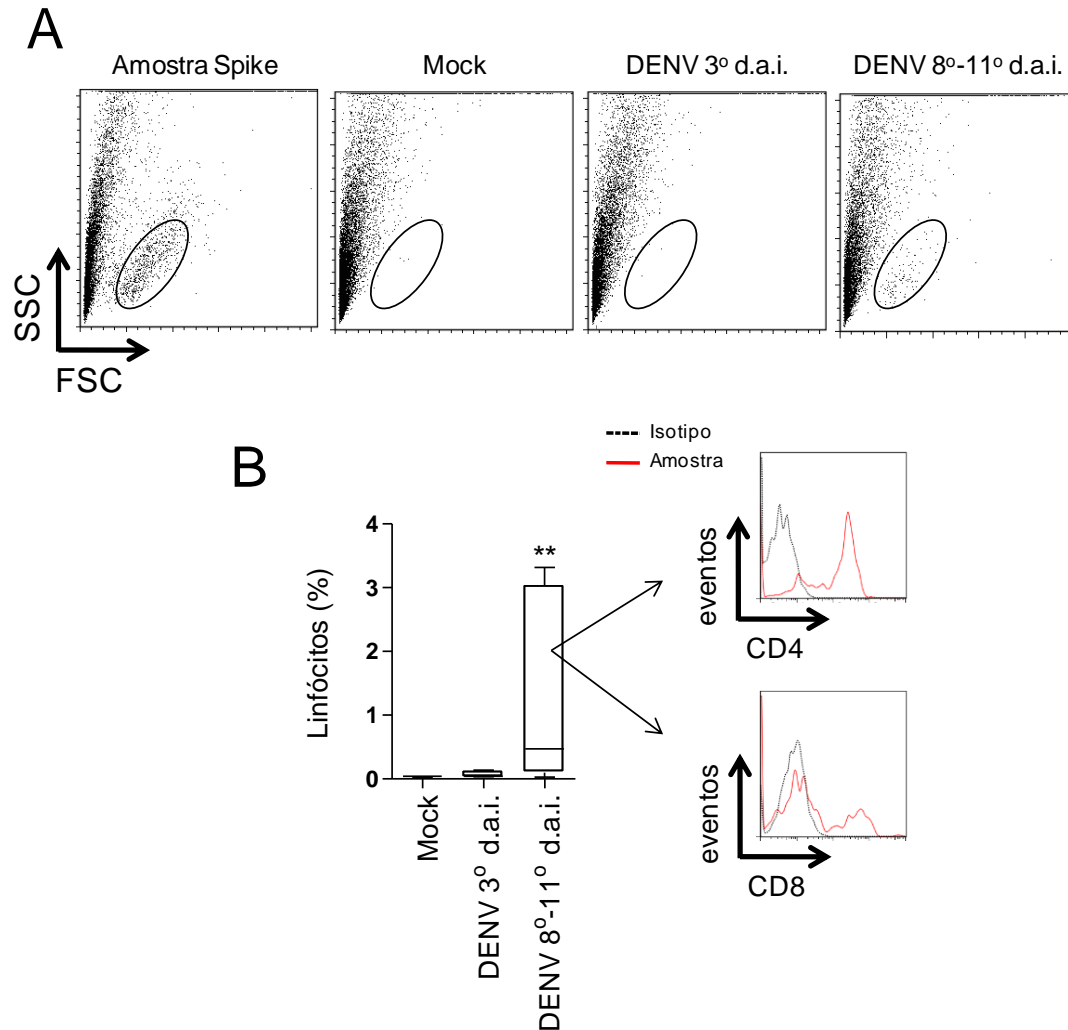


Figura 4.5. Infiltrado linfocitário cerebral após infecção com DENV. Linfócitos foram isolados por gradiente de densidade a partir de cérebros de animais infectados com DENV2 no terceiro dia ou no período de 8 a 11 dias após a infecção. **(A)** Um cérebro de camundongo não infectado foi processado em conjunto com uma pequena quantidade de esplenócitos para controlar a técnica de isolamento (Amostra spike). Baseando-se nas células recuperadas nesta amostra, uma região analítica foi definida para determinação do infiltrado celular por avaliação citométrica. **(B)** Determinação quantitativa dos percentuais de infiltrado linfocitário expressos em mediana, intervalos interquartis e limites superior e inferior da distribuição de dados, exibindo também a marcação com anti-CD4 e anti-CD8 nas amostras dos pontos finais da cinética. Asterísticos representam diferença significativa quando comparado ao grupo mock utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (**p < 0,01). Dados referentes a 2 determinações independentes com n = 5 camundongos por grupo.

4.1.5 Resposta primária de células B no modelo de infecção com DENV

O estudo de cinética no modelo animal abordado também se estendeu à avaliação da resposta de células B, que foi examinada segundo a expressão de B220 (CD45R) e IgD na superfície dos linfócitos, tanto no baço quanto no sangue dos camundongos infectados, e também pela presença de anticorpos anti-NS1 no plasma destes animais. Quanto aos percentuais de linfócitos B220⁺, não observamos diferenças significativas entres os diferentes pontos da cinética, sendo detectada grande variação nos dados, principalmente nas amostras de sangue. Os ensaios de ELISA para detectar anticorpos anti-NS1 no plasma dos animais infectados foram realizados não somente para inferir uma resposta de células secretoras de anticorpos, mas também para evidenciar a replicação do vírus no hospedeiro, uma vez que esta proteína, por ser não estrutural, só aparece após a replicação viral. Anticorpos IgM anti-NS1 foram detectados a partir do quinto dia após a infecção, chegando a títulos com média de 1/200 nos pontos finais do estudo (8 a 11 dias), enquanto que os anticorpos IgG anti-NS1 somente apareceram nos pontos finais do estudo com títulos de aproximadamente 1/700 (Figura 4.6).

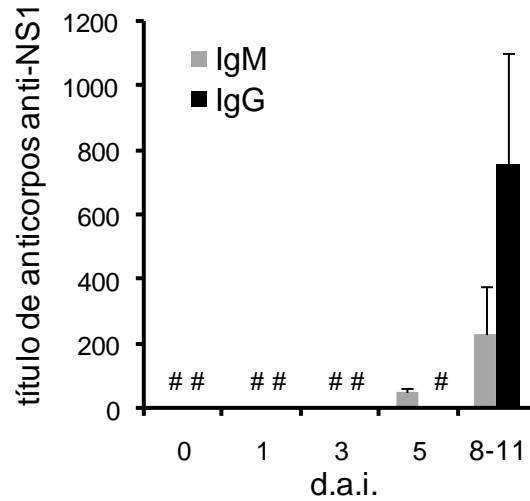


Figura 4.6. Resposta humoral na infecção primária por DENV em camundongos BALB/c. Animais BALB/c inoculados com DENV2 pela via i.c. foram avaliados quanto à resposta de células B mediante avaliação da resposta humoral por ensaios de ELISA. Ensaio para anticorpos IgM e IgG anti-NS1 nas amostras de plasma obtidas dos animais infectados. d.a.i. = dias após a infecção, # valor indetectável. Dados referentes a 3 experimentos independentes com n = 5 animais por grupo.

Na sequência, em um experimento a parte, utilizamos uma abordagem analítica citométrica na qual investigamos a expressão de B220 e IgD considerando populações de alta ($B220^{+}_{ag}$) ou baixa ($B220^{+}_{bg}$) granulocidade, uma vez que a complexidade interna (SSC) pode refletir no aumento de trabalho celular e sendo assim sugerir uma ativação celular. Nesta abordagem, analisamos a perda da expressão de IgD na superfície das células $B220^{+}$ para analisar o subgrupo de células B que provavelmente exerceram reconhecimento antigênico e são potenciais secretoras de imunoglobulinas (Figura 4.7 A). Focando nos pontos finais da cinética, momento quando observamos com mais evidência a resposta humoral anti-NS1, notamos que, tanto no baço quanto no sangue, houve aumento no percentual fenotípico $B220^{+}_{ag}IgD^{-}$ nos animais infectados comparados ao controle, sendo esta diferença mais discrepante nas amostras de sangue periférico. Não foram observadas diferenças quanto ao fenótipo $B220^{+}_{bg}IgD^{-}$ entre os grupos *mock* e infectado nas amostras de baço e sangue (Figura 4.7 B e C). Vale ressaltar que os eventos analisados nesta abordagem foram negativos para o marcador CD4, que foi utilizado para minimizar a interferência com outras populações celulares não relacionadas. Coletivamente, os dados mostram a participação da vertente humoral em resposta à infecção por via i.c. e replicação de DENV2 com ativação e produção de anticorpos anti-NS1 pelos linfócitos B.

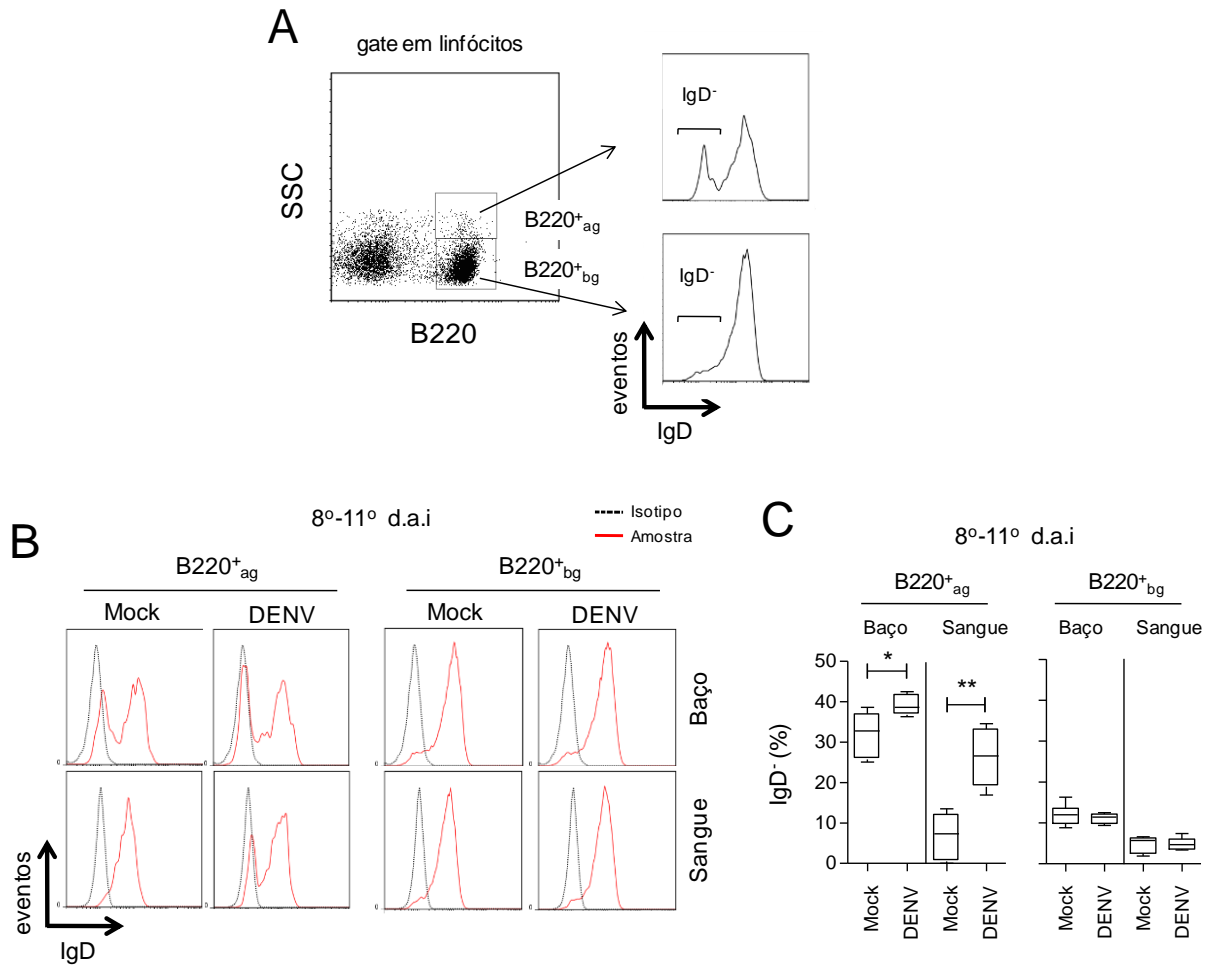


Figura 4.7. Ativação de linfócitos B na infecção primária por DENV. Animais BALB/c (n=5) inoculados com DENV pela via i.c. foram avaliados quanto à resposta de células B utilizando o marcador B220 (CD45R) e IgD para aferições citométricas. **(A)** Ilustração da estratégia de análise de células B220⁺ com alta (B220⁺_{ag}) ou baixa (B220⁺_{bg}) granulosidade (SSC), quanto à expressão de IgD. Uma região foi delimitada para medir o percentual de células B220⁺IgD⁻. **(B)** Representação de histogramas e **(C)** valores percentuais de células B220⁺IgD⁻ presentes no baço e no sangue avaliadas nas regiões de maior ou menor complexidade interna nos pontos finais do estudo da cinética.. Asterísticos representam diferença significativa quando comparado ao grupo *mock* utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05; **p < 0,01), d.a.i. = dias após a infecção.

4.1.6 Citocinas relacionadas à inflamação presentes no sangue de animais BALB/c infectados com DENV

Tendo sido evidenciada a participação de linfócitos T e B em resposta à infecção intracerebral no modelo apresentado, a investigação de citocinas que medeiam o processo inflamatório nos pareceu ser o próximo passo na caracterização do modelo. Para tal fim, verificamos a presença de citocinas pró-inflamatórias no sangue dos animais infectados na tentativa de não apenas correlacionar os achados à uma resposta patogênica, mas também para qualificar a resposta celular contra a infecção. Utilizando um ensaio multiplex de detecção de citocinas (CBA – *cytometric bead array*), amostras de plasma extraídas de animais infectados foram testadas quanto à presença das seguintes citocinas: IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6.

Observamos que os níveis da maioria das citocinas analisadas (IL-12p70, TNF- α , MCP-1 e IL-10) tinham níveis elevados quando comparado aos níveis das mesmas citocinas no plasma de animais não infectados, já no primeiro dia de infecção (Figura 4.8). Entretanto, observamos uma redução nos níveis de quase todas as citocinas estudadas no terceiro dia, sendo que IL-12p70, TNF- α e IL-10 voltaram a elevar no sétimo dia após a inoculação viral. Já em relação a citocina pró-inflamatória IFN- γ , observamos níveis basais durante quase todo o estudo e encontramos um aumento significativo destes níveis nos animais infectados durante os últimos dias da cinética (Figura 4.8). Não detectamos alterações significativas nos níveis de IL-6 ao longo da cinética (Figura 4.8).

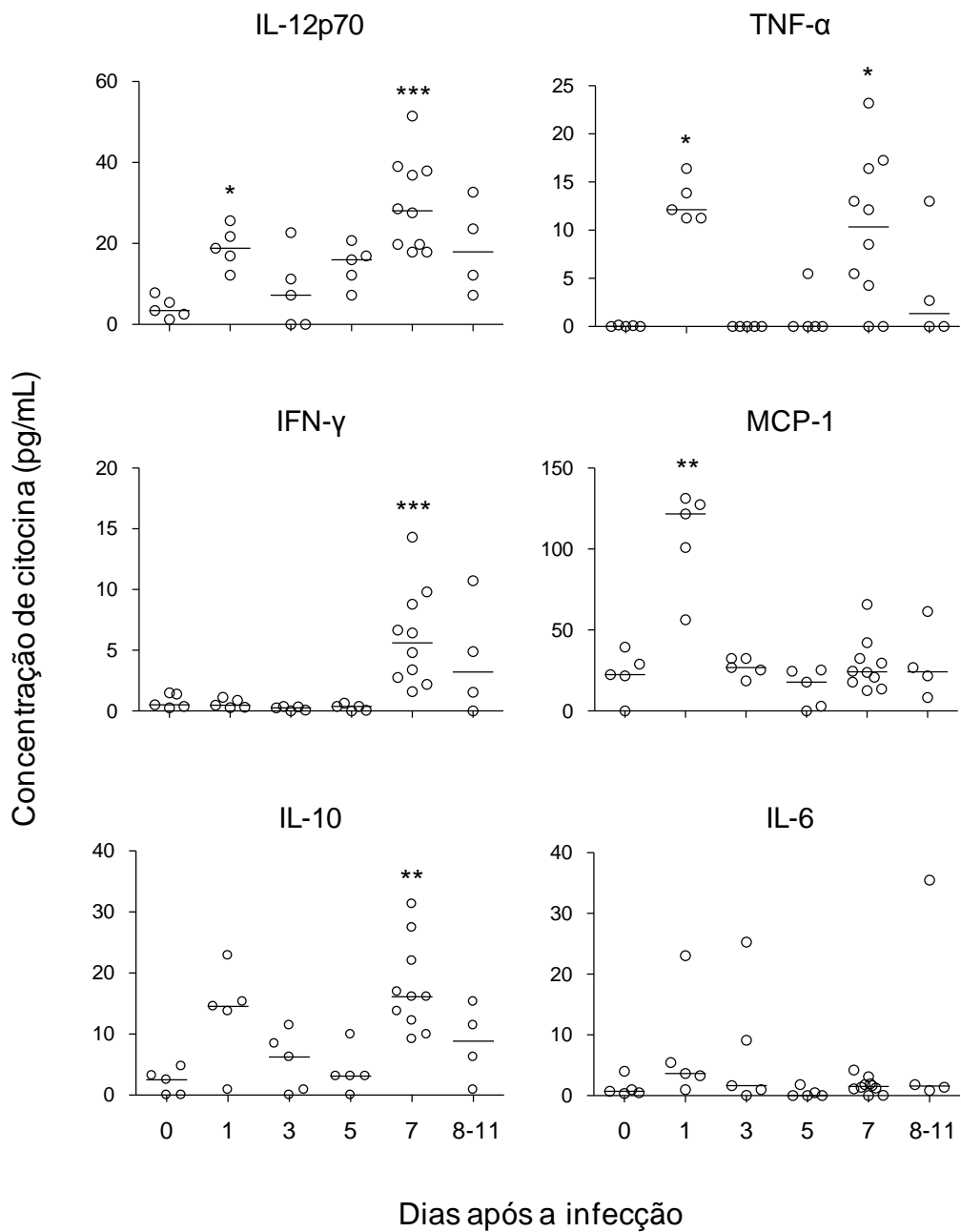


Figura 4.8. Determinação de citocinas relacionadas à inflamação no plasma de camundongos BALB/c infectados com DENV2 por via i.c. Amostras de plasma de camundongos BALB/c (n de no mínimo 4 por grupo) infectados com DENV2 foram coletadas em diferentes pontos da cinética e testadas quanto à presença de IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 mediante técnica multiplex de detecção CBA (*cytometric bead array*). Valores representados individualmente em pg/mL com mediana da distribuição de dados. Asterísticos representam diferença significativa quando comparado ao grupo de animais não infectados utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.7 Resumo da resposta imune primária induzida contra o DENV

Resumo das principais alterações observadas (Tabela 4.1) nesta primeira etapa do estudo, onde a resposta imune primária induzida por DENV foi avaliada em camundongos BALB/c infectados pela via i.c. em relação aos grupos controles, não infectados.

Tabela 4.1: Resumo das alterações da resposta imune na infecção primária com DENV2 por via i.c.

órgão/sítio	parâmetro	dias após a infecção		
		0 -1	1 - 5	5 -11
Baço	TCD4 ⁺	=	=	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	++	+/-
	TCD8 ⁺	=	+	++
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	++	=
	B220 ⁺	=	=	=
	B220 ⁺ _{ag} IgD ⁻	n/a	n/a	+
	B220 ⁺ _{bg} IgD ⁻	n/a	n/a	=
Sangue	TCD4 ⁺	=	=	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	++	++
	TCD8 ⁺	=	+	+
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	++	=
	B220 ⁺	=	=	=
	B220 ⁺ _{ag} IgD ⁻	n/a	n/a	++
	B220 ⁺ _{bg} IgD ⁻	n/a	n/a	=
	IgM anti-NS1	=	+/-	+
	IgG anti-NS1	=	=	++
	IL-12p70	+	+/-	+++
	TNF- α	+	=	+
	IFN- γ	=	=	+++
	MCP-1	++	=	=
	IL-10	+/-	=	++
IL-6	=	=	=	
Fígado	TCD4 ⁺	=	=	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	=	++
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD62L ⁻	=	=	+/-
	TCD8 ⁺	=	=	++
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	=	+
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD62L ⁻	=	+	+/-
Cérebro	infiltrado linfocitário	=	=	++

Legenda: = sem alteração; +/- elevação não significativa; + elevação significativa ($p < 0,05$); ++ elevação significativa ($p < 0,01$); n/a não avaliado; “ag” alta granulosidade; “bg” baixa granulosidade. Os fenótipos celulares são medidos em valores percentuais e as citocinas presentes no sangue em pg/ml.

4.2 Vacinas de DNA que codificam os antígenos NS1, NS3 ou E do vírus DENV2

O Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções virais (LABIFIV), ao longo dos últimos anos, vem mostrando a eficácia de vacinas de DNA anti-dengue com base no modelo murino BALB/c imunocompetente infectados intracerebralmente com DENV2 neuroadaptado. Dentre diversos protótipos de vacinas de DNA desenvolvidos pelo laboratório, aqui abordaremos os plasmídeos vacinais que codificam a proteína NS1 (pcTPANS1), NS3 (pcTPANS3) ou o ectodomínio da proteína E, domínios I, II e III, (pE1D2) do vírus DENV2. Ressaltamos que os genes inteiros ou fragmentos destes contidos nos plasmídeos são expressos fusionados ao peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), o qual direciona as proteínas recombinantes para a via de secreção.

4.2.1 Avaliação da integridade dos plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2

As vacinas de DNA pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 (Figura 4.9 A), produzidas e isoladas a partir de bactérias *E. coli*, foram inicialmente testadas quanto a sua integridade mediante digestão com enzimas de restrição e avaliação por eletroforese em gel de agarose. Os produtos das digestões foram confirmados pela liberação de fragmentos com tamanhos condizentes com o esperado: (i) pcTPANS1, digerido com *EcoRV* e *Xho* libera o fragmento correspondente ao gene NS1 com tamanho de 1,1 Kb; (ii) pcTPANS3, digerido com *EcoRV* e *XbaI* libera o fragmento correspondente ao gene NS3 com tamanho de 2,0 Kb; (iii) pE1D2, digerido com *EcoRV* e *XbaI* libera o fragmento que corresponde à sequência que codifica o ectodomínio da proteína E com tamanho de 1,2 Kb (Figura 4.9 B).

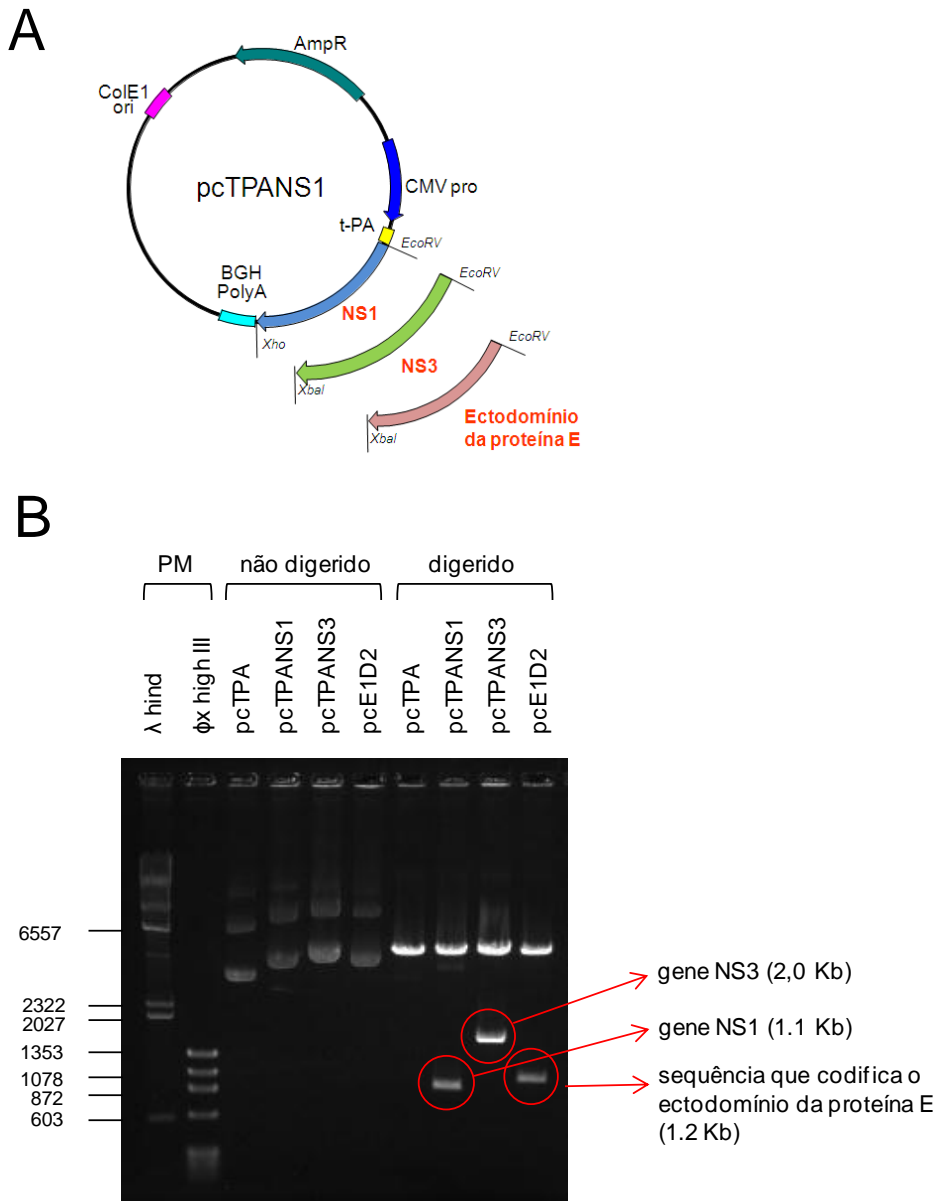


Figura 4.9. Representação esquemática dos plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 e avaliação de integridade em gel de eletroforese. (A) Os plasmídeos vacinais pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 previamente desenvolvidos pelo grupo possuem as sequências de interesse (NS1, NS3 ou o ectodomínio da proteína E) fusionadas à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA). Este conjunto tem sua expressão regida pelo promotor de citomegalovírus (CMV pro) e é estabilizado pela cauda de poliadenilação derivada do hormônio de crescimento bovino (BGH polyA) na extremidade 3'. Os constructos ainda contêm um gene de resistência à ampicilina (AmpR) e uma origem de replicação em célula bacteriana (ColE1 ori). O esquema mostra os sítios de clivagem das enzimas de restrição *EcoRV*, *Xho* e *XbaI*. **(B)** DNAs plasmidiais antes e após digestão com enzimas de restrição indicadas evidenciando a liberação do inserto correspondente aos genes de interesse. λ hind e ϕ x high III – padrões de peso molecular (PM).

4.2.2 Proteção contra desafio letal com DENV2 induzida após imunização com pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2

Após imunização por via intramuscular, as vacinas pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2 conferiram aos camundongos BALB/c níveis variáveis de proteção, sob aspectos de sobrevivência e morbidade, contra uma infecção letal por DENV2. O percentual de sobrevivência dos animais desafiados que receberam as diferentes vacinas variou de 90 a 100 % até 21 dias após o desafio. Apesar destes valores próximos, o número de animais imunizados que desenvolveram sintomas ao longo dos 21 dias após o desafio foi de 2/30 (6,7 %), 3/30 (10,0 %) e 8/20 (40,0 %) para pE1D2, pcTPANS1 e pcTPANS3, respectivamente, o que caracteriza a maior capacidade de proteção das vacinas pE1D2 e pcTPANS1 em comparação com a imunização com pcTPANS3. Quanto ao grupo controle não imunizado (grupo DENV2) ou o que recebeu o plasmídeo vetor pcTPA, a taxa de sobrevivência foi de 35 % e 20 %, respectivamente, sendo que a maioria apresentou sintomas relacionados à infecção (Figura 4.10 A e B). Com o objetivo de investigar o cenário imunológico gerado pela vacinação com os diversos plasmídeos, procedemos com um estudo de imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias em diversos sítios nos camundongos vacinados, bem como com a pesquisa de citocinas no plasma destes animais.

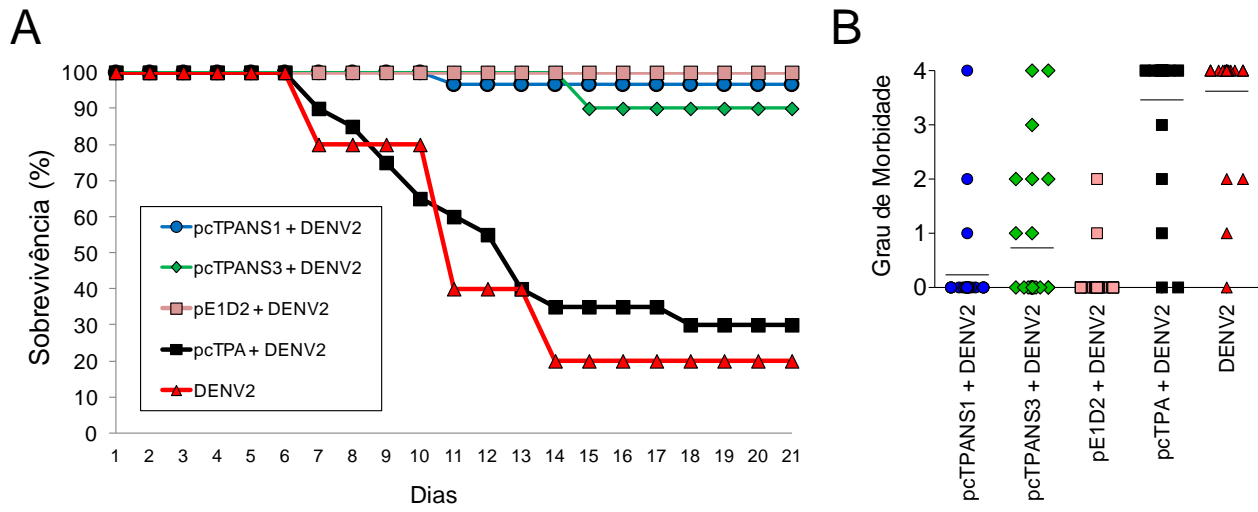


Figura 4.10. Sobrevivência e morbidade de camundongos imunizados com vacinas de DNA contendo os genes NS1, NS3 ou E e desafiados com DENV2. Grupos de camundongos foram imunizados por via intramuscular, desafiados com DENV2 por via i.c. e observados por 21 dias após a infecção letal. Animais não imunizados ou administrados com o plasmídeo controle pcTPA também foram submetidos ao mesmo procedimento de desafio viral. **(A)** Percentual de sobrevivência e **(B)** análise da morbidade, na qual diferentes graus foram atribuídos às manifestações sintomáticas em uma escala subjetiva variando de 0 a 4 (0 = sem efeito aparente, 1 = paralisia moderada em uma das patas traseiras ou presença de alterações moderadas na coluna espinhal, 2 = paralisia grave em uma das patas traseiras e alteração moderada na coluna espinhal ou paralisia grave em duas patas, 3 = paralisia grave em duas ou mais patas e deformação importante na coluna espinhal, 4 = morte).

4.2.3 Antígenos virais NS1, NS3 e E do vírus DENV e a imunidade celular

Tendo em vista a variabilidade protetora gerada pelos antígenos NS1, NS3 ou o ectodomínio da proteína E expressos a partir de vacinas de DNA em experimentos *in vivo*, direcionamos nossas pesquisas para verificar a influência destes antígenos na imunidade celular, analisando as populações linfocitárias de diversos sítios. Dessa forma, poderíamos correlacionar a contribuição individual destas proteínas virais na determinação de um cenário imunológico de maior ou menor resistência à infecção por DENV no modelo murino com inoculação por via i.c.

Executamos o protocolo padrão de imunização para as três vacinas supracitadas (duas doses por via i.m. com intervalo de duas semanas), utilizando em paralelo animais inoculados com o plasmídeo vetor, pcTPA, e animais não inoculados como controles (naïves). Duas semanas após a segunda dose de DNA, os animais foram sacrificados e coletamos o sangue, baço, linfonodos poplíteos (este último por ser o linfonodo de drenagem próximo ao local de aplicação dos plasmídeos) e o fígado. As amostras foram processadas e preparadas para análise fenotípica por citometria de fluxo usando conjuntamente os seguintes marcadores: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB e anti-B220. A abordagem analítica para a ativação celular visando a expressão de CD45RB na superfície dos linfócitos foi procedida como descrito no item 4.1.2.

Duas semanas após o segundo estímulo com pcTPANS1, os animais apresentaram discreto aumento no percentual de células CD8⁺ no baço, sangue e fígado quando comparado aos grupos controles. No sangue, foi evidenciado um aumento significativo na fração de células B220⁺ acompanhada de redução do percentual de células CD4⁺. Apesar de não ser detectada nenhuma alteração nos percentuais das populações de CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos poplíteos dos animais que receberam pcTPANS1, observamos uma discreta redução nos percentuais dessas populações ativadas (CD4⁺CD45RB^{low} e CD8⁺CD45RB^{low}) em relação aos controles pcTPA e naïve (Figura 4.11).

pcTPANS1

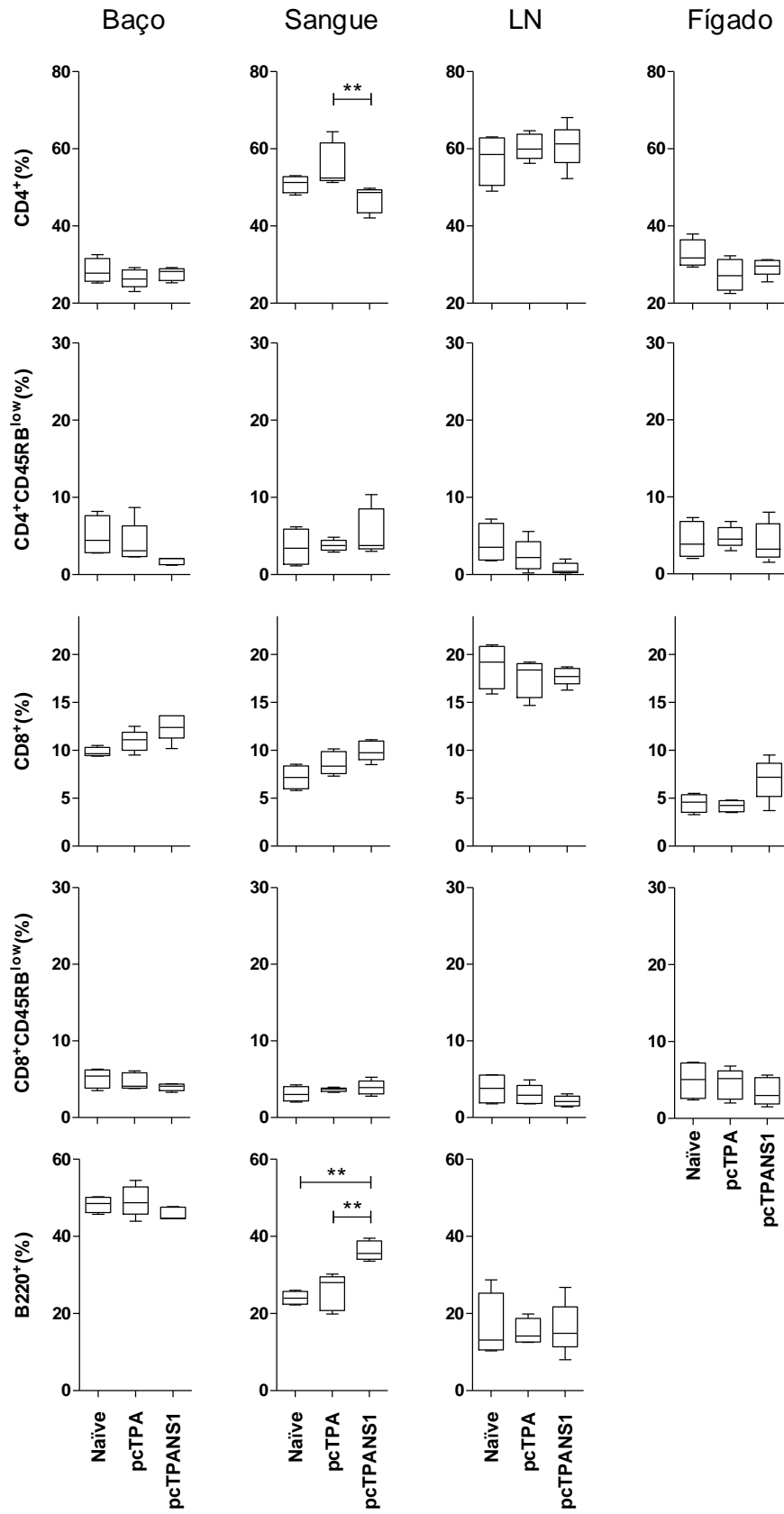


Figura 4.11. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pcTPANS1. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados por via i.m. com duas doses de pcTPANS1 intercaladas por duas semanas. Duas semanas após a segunda dose, amostras de baço, sangue, linfonodos poplíteos (LN) e fígado foram processadas para análise citométrica dos linfócitos presentes. Os marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB e anti-B220 foram considerados na análise de expressão destas moléculas na superfície das células. Aferições de células CD4⁺, CD8⁺ ou B220⁺ foram executadas considerando a região de linfócitos e a expressão de CD45RB foi medida considerando apenas eventos CD4⁺ ou CD8⁺ como indicado. Valores expressos em percentuais com mediana e intervalos interquartis. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05 e **p<0,01. Dados representativos de três experimentos independentes.

Em contrapartida, a introdução do antígeno NS3 do vírus DENV expresso a partir do plasmídeo pcTPANS3 evidenciou uma resposta celular marcante com aumento geral no percentual de células T ativadas ($CD4^+CD45RB^{low}$ e $CD8^+CD45RB^{low}$) esplênicas, sanguíneas e hepáticas. As populações de células $CD4^+$ e $CD8^+$ também se mostraram aumentadas em termos percentuais no baço dos animais estimulados com NS3 em relação aos controles, enquanto que no fígado foi detectado aumento nos percentuais de células $CD4^+$. No sangue foi observado aumento percentual de células $B220^+$ com redução de $CD4^+$. Nos linfonodos poplíteos identificamos redução percentual de células com o fenótipo $CD4^+CD45RB^{low}$ em relação aos controles, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 4.12).

pcTPANS3

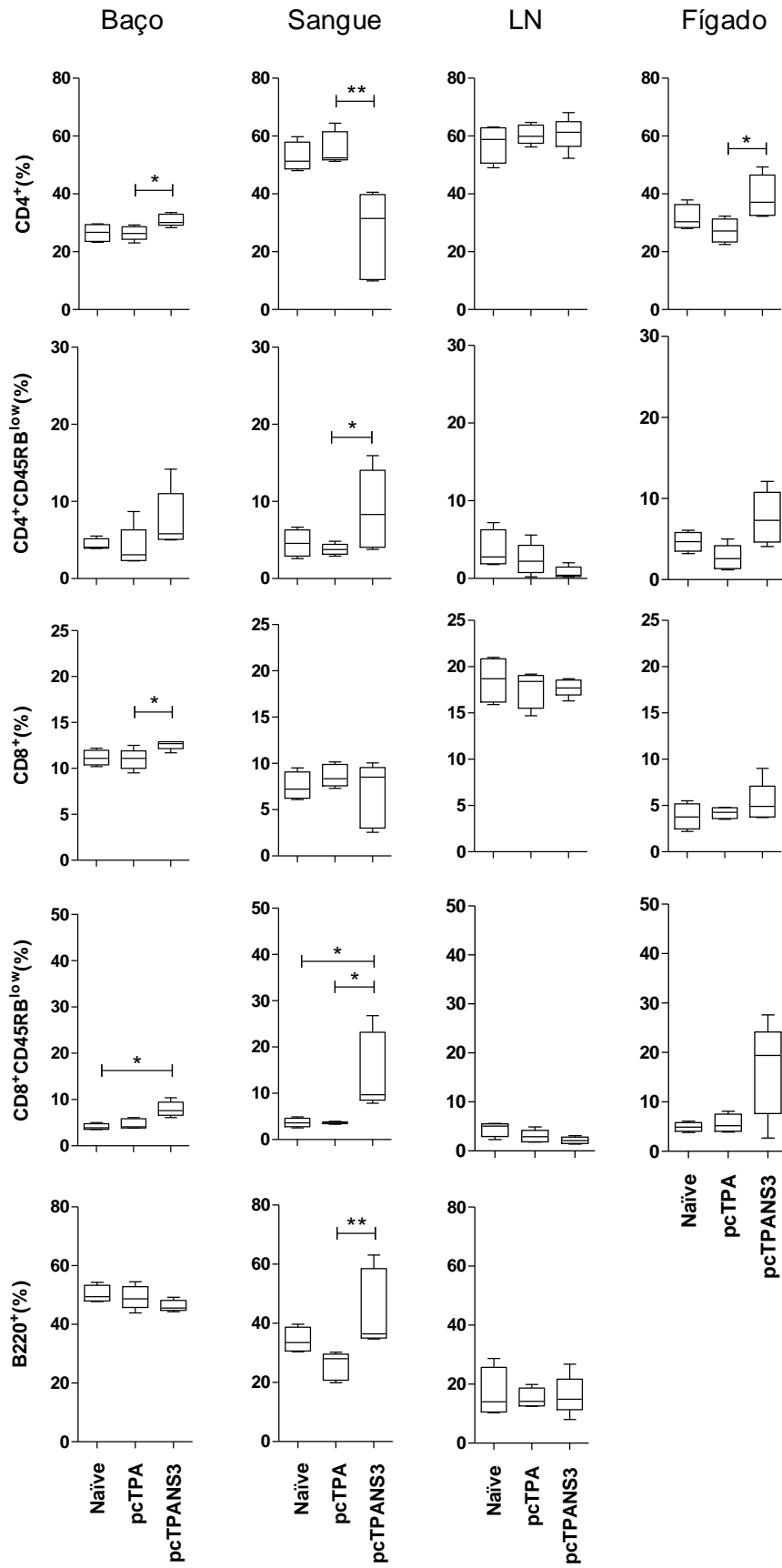


Figura 4.12. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pcTPANS3. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados por via i.m. com duas doses de pcTPANS3 intercaladas por duas semanas. Duas semanas após a segunda dose, amostras de baço, sangue, linfonodos poplíteos (LN) e fígado foram processadas para análise citométrica dos linfócitos presentes. Os marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB e anti-B220 foram considerados na análise de expressão destas moléculas na superfície das células. Aferições de células CD4⁺, CD8⁺ ou B220⁺ foram executadas considerando a região de linfócitos e a expressão de CD45RB foi medida considerando apenas eventos CD4⁺ ou CD8⁺ como indicado. Valores expressos em percentuais com mediana e intervalos interquartis. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05 e **p<0,01. Dados representativos de três experimentos independentes.

O plasmídeo pE1D2, que codifica o ectodomínio da proteína E (correspondente a 80% da proteína do envelope viral com os domínios I, II e III), também priorizou uma resposta de células T promovendo aumento nos percentuais de células CD4⁺ e CD8⁺ presentes no sangue, acompanhado de alta ativação destas populações no baço, quando comparados aos grupos controles. Observamos também, uma redução percentual de células B220⁺ tanto no baço quanto no sangue. Nos linfonodos poplíteos, identificamos um acréscimo não significativo no percentual de células CD4⁺ em relação aos controles. Nas amostras de fígado não foram detectadas alterações relevantes (Figura 4.13).

pE1D2

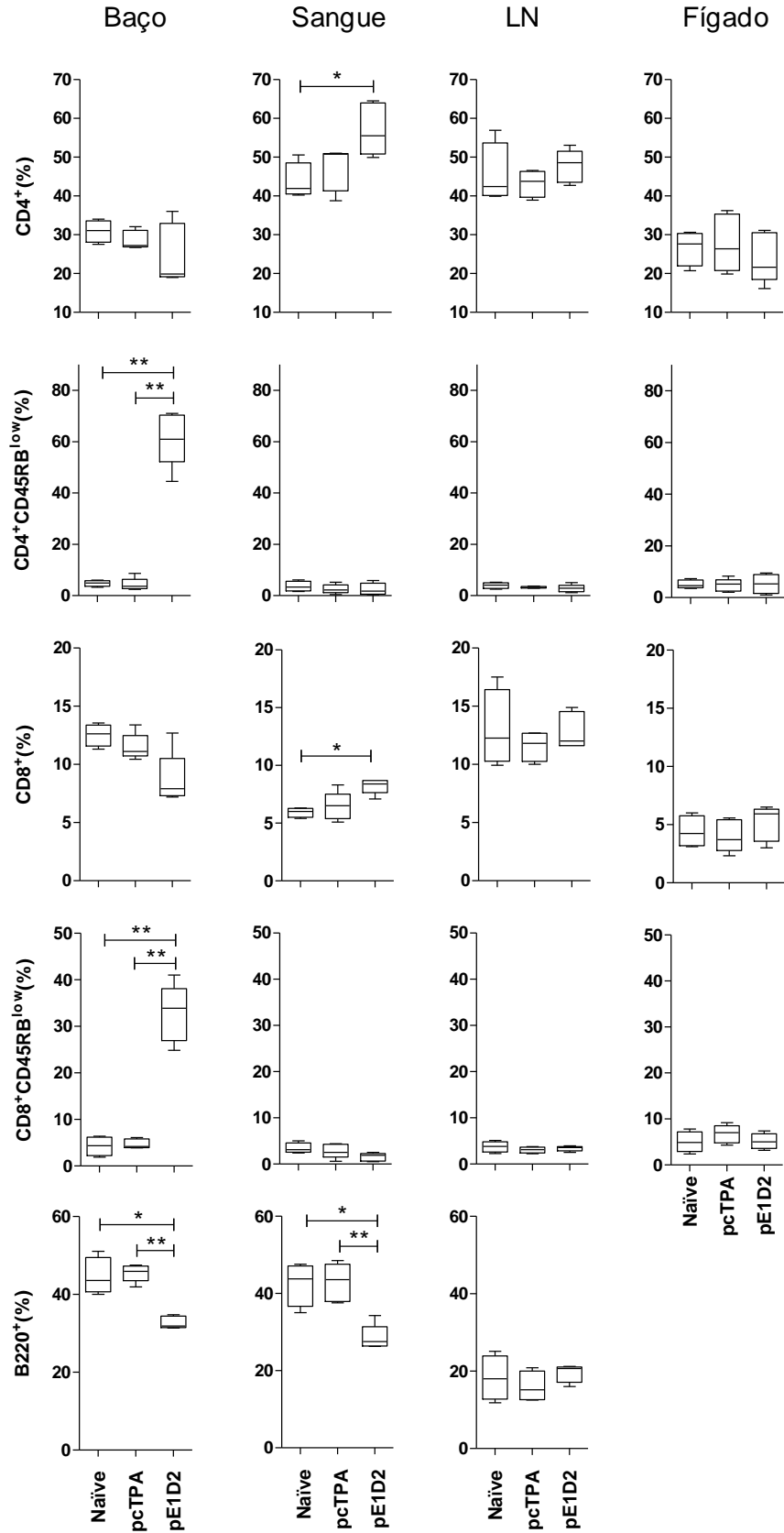


Figura 4.13. Distribuição linfocitária em animais imunizados com pE1D2. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados por via i.m. com duas doses de pE1D2 intercaladas por duas semanas. Duas semanas após a segunda dose, amostras de baço, sangue, linfonodos poplíteos (LN) e fígado foram processadas para análise citométrica dos linfócitos presentes. Os marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB e anti-B220 foram considerados na análise de expressão destas moléculas na superfície das células. Aferições de células CD4⁺, CD8⁺ ou B220⁺ foram executadas considerando a região de linfócitos e a expressão de CD45RB foi medida considerando apenas eventos CD4⁺ ou CD8⁺ como indicado. Valores expressos em percentuais com mediana e intervalos interquartis. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05 e **p<0,01. Dados representativos de dois experimentos independentes.

De um modo geral, vimos que a vacinação com os plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2 foi capaz de promover diferentes perfis populacionais de células TCD4⁺ e TCD8⁺, bem como de suas subpopulações ativadas (CD45RB^{low}), nos diversos sítios estudados. Além disso, a distribuição de células B nos órgãos linfóides e na periferia também variou nos diferentes grupos vacinais.

4.2.4 Determinação dos níveis de citocinas no plasma de animais imunizados com pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2

Continuamos a investigação nos animais vacinados com relação a determinação de citocinas circulantes para averiguar um possível reflexo da resposta imune celular induzida peculiarmente pela imunização com os distintos antígenos expressos a partir do plasmídeo vetor pcTPA. Observamos que duas semanas após a segunda dose de DNA, os animais vacinados apresentaram uma quantidade muito baixa de citocinas (IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6) circulantes, com detecção no limite inferior das curvas padrão destes analitos. Sendo assim, utilizamos uma abordagem subquantitativa onde medimos o aumento percentual da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) dos complexos de detecção de citocinas em relação ao branco de análise (diluyente). Sob esta análise, a maioria das citocinas analisadas (IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-6) não se mostrou diferente em relação ao controle pcTPA, com exceção de MCP-1, em que observamos uma tendência de aumento nos animais vacinados com pcTPANS3 e pE1D2 em relação ao controle e mesmo aos animais que receberam pcTPANS1 (Figura 4.14).

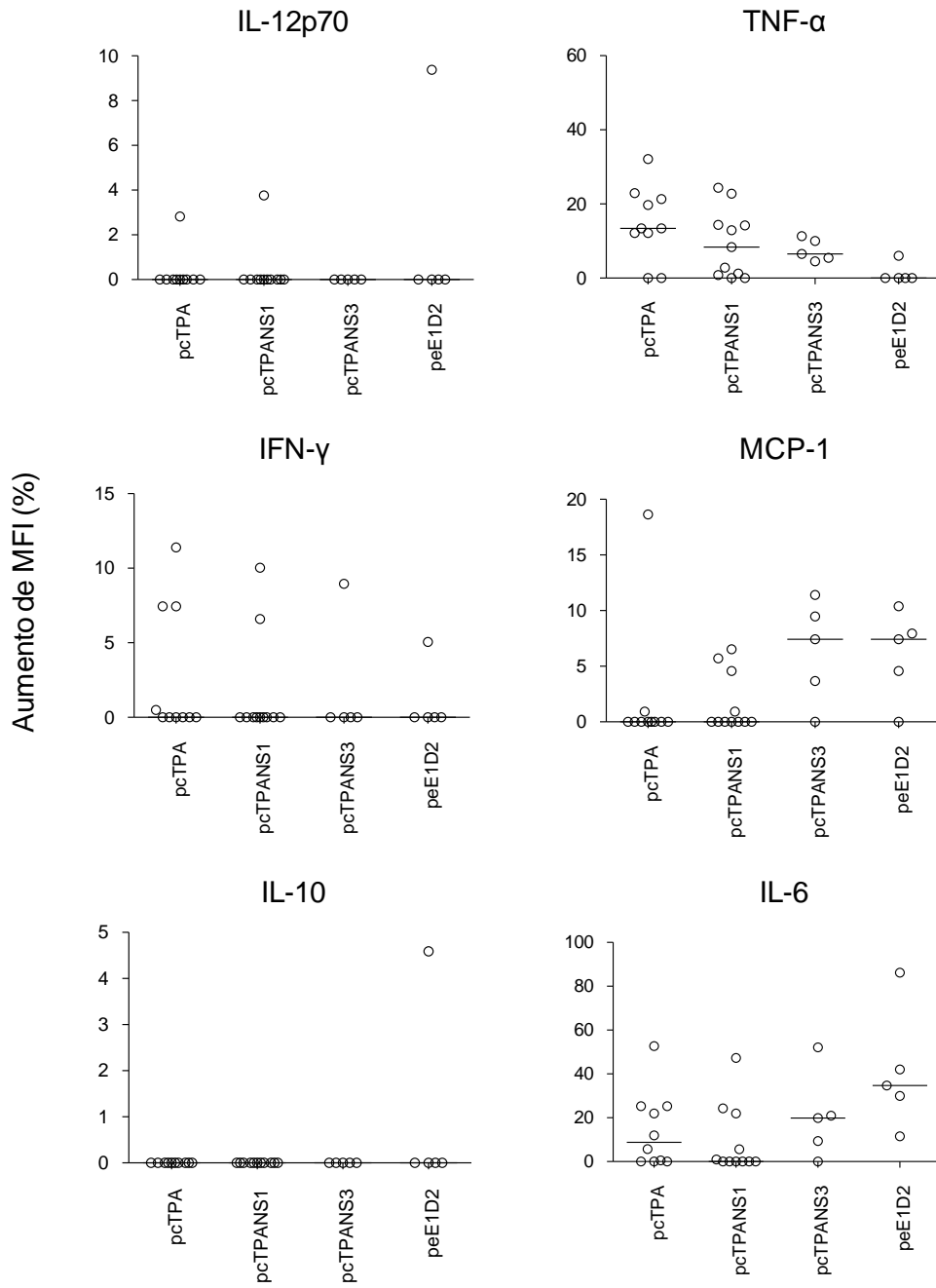


Figura 4.14. Análise dos níveis de citocinas em animais imunizados com vacinas de DNA que codificam NS1, NS3 ou o ectodomínio da proteína E de DENV2. Grupos de camundongos BALB/c (n maior ou igual a 5) foram imunizados por via i.m. com duas doses dos plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 ou pE1D2 com intervalo de duas semanas entre as aplicações. Duas semanas após a segunda dose, as citocinas IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 foram medidas no plasma extraído dos animais vacinados mediante técnica de CBA. Valores expressos em aumento percentual de mediana da intensidade de fluorescência MFI em relação ao branco (diluído proveniente do kit comercial) segundo a transformação:

$$\text{Aumento de MFI \%} = 1 - (\text{MFI}_{\text{amostra}}/\text{MFI}_{\text{branco}}) \times 100$$

4.2.5 Resumo da resposta imune induzida com as vacinas de DNA contra DENV

Para sumarizar as alterações observadas nos animais vacinados com os diferentes plasmídeos (pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2), os dados foram compilados de maneira comparativa, sendo exibido na Tabela 4.2. As comparações foram feitas em relação aos animais que foram inoculados com pcTPA (plasmídeo controle).

Tabela 4.2. Resumo das alterações da resposta imune induzida pelas vacinas de DNA

órgão/sítio	parâmetro	antígenos		
		NS1	NS3	E
Baço	TCD4 ⁺	=	+	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	+/-	++
	TCD8 ⁺	+/-	+	+
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	+	++
	B220 ⁺	=	=	--
Sangue	TCD4 ⁺	=	--	+
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	+	=
	TCD8 ⁺	+/-	=	+
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	+	=
	B220 ⁺	++	++	--
	IL-12p70	=	=	=
	TNF- α	=	=	=
	IFN- γ	=	=	=
	MCP-1	=	+/-	+/-
	IL-10	=	=	=
	IL-6	=	=	+/-
Linfonodo	TCD4 ⁺	=	=	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	=	=
	TCD8 ⁺	=	=	=
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	=	=	=
	B220 ⁺	=	=	=
Fígado	TCD4 ⁺	=	+	=
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	=	+/-	=
	TCD8 ⁺	=	=	=
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	+/-	+/-	=

Legenda: -- redução significativa ($p < 0,01$); - redução significativa ($p < 0,05$); = sem alteração; +/- elevação não significativa; + elevação significativa ($p < 0,05$); ++ elevação significativa ($p < 0,01$). Os fenótipos celulares são medidos em valores percentuais e as citocinas presentes no sangue foram estimadas mediante o aumento de MFI em relação ao branco de análise (vide tópico 4.2.4).

4.3 Resposta imune adaptativa promovida pelo antígeno NS1 de DENV2 expresso a partir do plasmídeo pcTPANS1

Após a investigação dos efeitos da infecção primária no modelo animal empregado, e também tendo conhecido alguns efeitos promovidos pela vacinação com os plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2, o próximo passo seria investigar a resposta imune adaptativa induzida por estes antígenos expressos sob essa abordagem vacinal. Apesar deste trabalho envolver as três vacinas de DNA supracitadas, demos sequência, principalmente, aos estudos com pcTPANS1 devido ao fato da proteína NS1 ser bastante intrigante e o seu papel na proteção ou patogênese da dengue ainda não está completamente elucidado. Além disso, um maior número de experimento foi realizado em paralelo no LABFIV com esta vacina de DNA, o que nos possibilita uma melhor correlação de dados.

Tendo em vista o potencial protetor conferido pela proteína NS1, a resposta imune adaptativa induzida por este antígeno foi investigada com ensaios de fenotipagem de subpopulações linfocitárias em diversos sítios, ensaios de transferência de células, análise da resposta humoral e de citocinas presentes no soro dos animais vacinados e desafiados.

4.3.1 Cinética de ativação de células T em resposta à introdução do DENV em animais imunizados com pcTPANS1

Com o objetivo de avaliar a sequência cronológica da resposta de diferentes subpopulações de linfócitos T dos animais vacinados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 realizamos um estudo de cinética, no qual consideramos os dias 0, 1, 3, 5, 7 e 8-11, após o desafio com DENV2, como pontos para avaliação. Foram feitas comparações entre grupos de animais (i) apenas desafiados (grupo DENV); (ii) animais que receberam duas doses do plasmídeo controle pcTPA e desafiados (grupo pcTPA + DENV); e (iii) animais que receberam duas doses de pcTPANS1 e o desafio com DENV (pcTPANS1 + DENV). Em cada ponto abordado no estudo de cinética, amostras

de baço e sangue foram coletadas e processadas para imunofenotipagem por citometria de fluxo. A ativação de células T foi analisada considerando conjuntamente os marcadores de superfície anti-CD3, anti-CD4, anti-CD45RB, anti-CD44 e anti-CD69 ou anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45RB, anti-CD44 e anti-CD69. Durante a análise citométrica, foram considerados os eventos contidos apenas na região de linfócitos demarcada a partir do gráfico de dispersão sob os parâmetros morfológicos FSC e SSC. A análise da ativação de células T baseada na expressão de CD45RB foi procedida como descrito anteriormente em 4.1.2. A expressão de CD69 na superfície das células T, um marcador de ativação recente, foi considerada em conjunto com a expressão de CD44^{hi}, a qual é relacionada com resposta de memória efetora e recirculação de células T. Dessa forma, os fenótipos CD44^{hi}CD69⁺ e CD44^{hi}CD69⁻ foram analisados em eventos CD3⁺CD4⁺ ou em CD3⁺CD8⁺ (Figura 4.15).

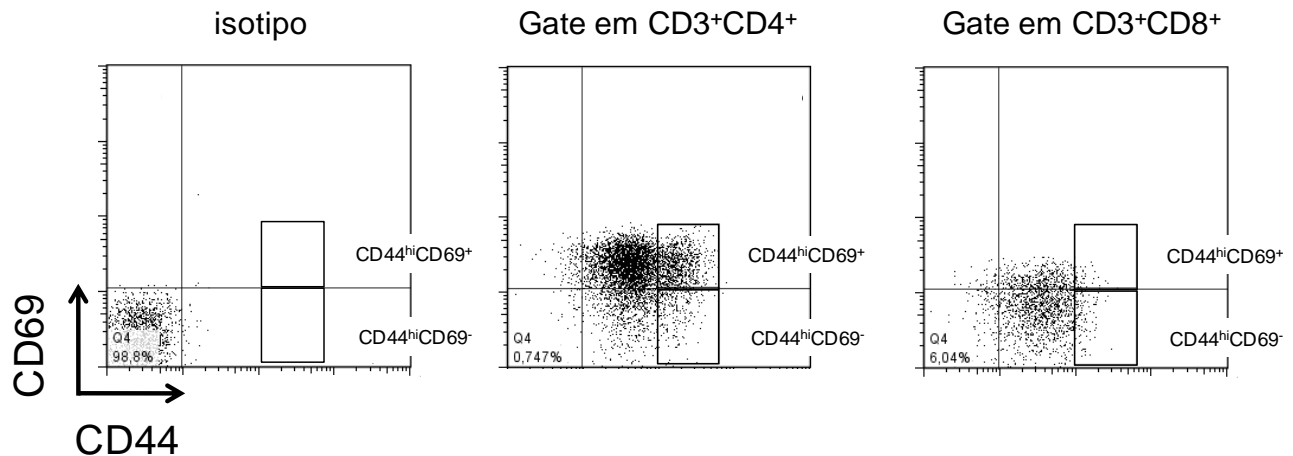


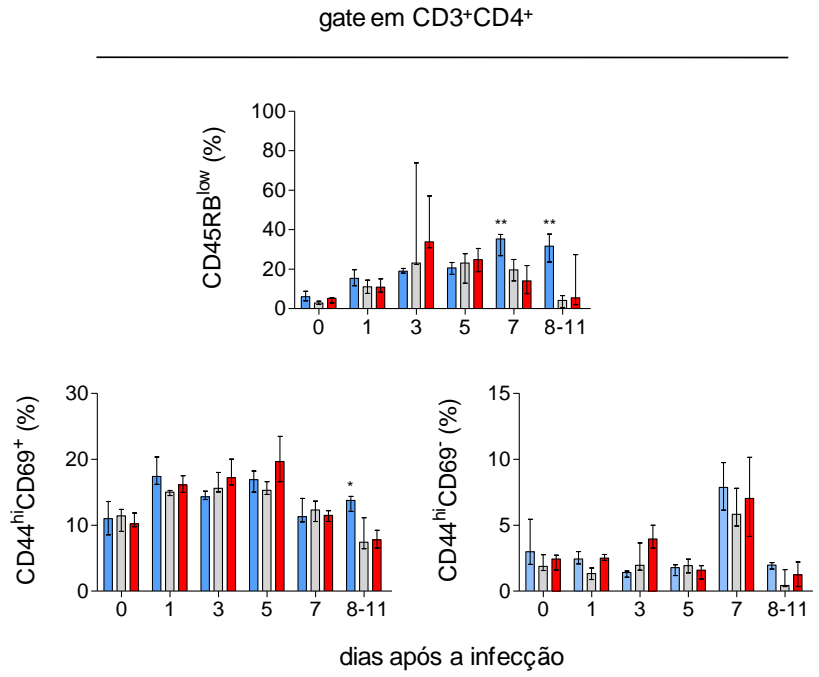
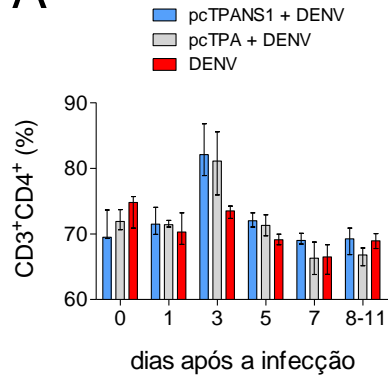
Figura 4.15. Estratégia de análise de ativação de células T baseada na expressão de CD44 e CD69. Amostras de esplenócitos foram coletadas de camundongos BALB/c em diversos pontos em um estudo de cinética da resposta imune adaptativa ao antígeno NS1 expresso a partir da vacina pcTPANS1. A partir do controle isotipo para cada marcação foram definidos quadrantes na representação citométrica de dispersão de pontos (*dot plot*) CD69 x CD44 para identificar as regiões relevantes. Os eventos analisados foram considerados na região de linfócitos e *gateados* em eventos CD3⁺CD4⁺ ou em eventos CD3⁺CD8⁺. Duas regiões foram criadas onde consideramos os fenótipos CD44^{hi}CD69⁺(acima) e CD44^{hi}CD69⁻(abaixo).

Observamos que no terceiro dia após o desafio com DENV2 houve um aumento percentual de esplenócitos com o fenótipo CD3⁺CD4⁺ mais marcante nos grupos pcTPANS1 + DENV e pcTPA + DENV, sendo este aumento apenas discreto nos animais somente desafiados (grupo DENV, Figura 4.14A). Considerando as células CD3⁺CD4⁺ (TCD4), quanto aos fenótipos de ativação celular, vimos que os percentuais de esplenócitos TCD4⁺CD45RB^{low} apresentaram um aumento entre o terceiro e o quinto dia nos grupos de animais desafiados e não imunizados (DENV e pcTPA + DENV), enquanto que existiu um aumento progressivo deste fenótipo no grupo dos animais vacinados, com percentuais significativamente mais elevados nos pontos 7 e 8-11 dias em relação aos outros grupos (Figura 4.14B). O percentual de células TCD4⁺ no baço com o fenótipo CD44^{hi}CD69⁺ exibiu um padrão semelhante entre os grupos estudados, com um aumento logo após o primeiro dia de infecção e redução a partir do quinto até o 8^o-11^o dia, com exceção dos animais vacinados os quais mantiveram níveis percentuais mais elevados deste fenótipo nos pontos finais do estudo da cinética. Ainda considerando as células TCD4⁺, o percentual de esplenócitos com o fenótipo CD44^{hi}CD69⁻ se manteve numa faixa de aproximadamente 1,5 % a 4 % com elevação dramática no sétimo dia após a infecção e retornando aos níveis basais no ponto 8-11 dias. Neste caso, não foram observadas diferenças relevantes nos níveis percentuais entres os grupos estudados (Fig. 4.16 A).

O percentual de células CD3⁺CD8⁺ no baço de todos os grupos estudados, diminuiu do primeiro ao terceiro dia após a infecção, tendo seus níveis restabelecidos à condição inicial a partir do quinto dia da cinética. Neste caso, foi observado que essas variações não foram tão dramáticas no grupo DENV com relação aos demais grupos (pcTPA + DENV e pcTPANS1 + DENV). Quanto aos fenótipos de ativação avaliados, foi visto que de forma análoga às células TCD4⁺, o percentual de células TCD8⁺CD45RB^{low} atingiu um pico entre o terceiro e quinto dia após a infecção nos grupos dos animais não vacinados (DENV e pcTPA + DENV), sendo estes níveis reduzidos aos níveis basais até os pontos finais do estudo da cinética (8-11 dias). Já no grupo dos animais que receberam pcTPANS1 o percentual fenotípico de células TCD8⁺CD45RB^{low} progrediu desde o início da cinética, atingindo níveis

significativamente maiores em relação aos outros grupos a partir do sétimo dia de infecção. Ainda no baço, em todos os grupos estudados as células TCD8⁺ apresentaram níveis basais inferiores a 0,23 % do fenótipo CD44^{hi}CD69⁺ até o terceiro dia de infecção. A partir do quinto dia os percentuais para este fenótipo começaram a aumentar formando um pico no sétimo dia, não sendo observada diferença significativa entre os grupos. Células TCD8⁺ com o fenótipo CD44^{hi}CD69⁻ se mostraram com seus percentuais aumentados a partir do primeiro dia após a infecção em todos os grupos formando um platô entre aproximadamente 5 % e 9 % até o sétimo dia de infecção. Nos pontos finais do estudo da cinética (8-11 dias), a presença deste fenótipo caiu dramaticamente no baço dos animais não vacinados (DENV e pcTPA + DENV), entretanto, nos animais que receberam a vacina pcTPANS1 esta redução não foi tão acentuada se mantendo em níveis significativamente maiores em relação aos demais grupos (Fig. 4.16 B).

A



B

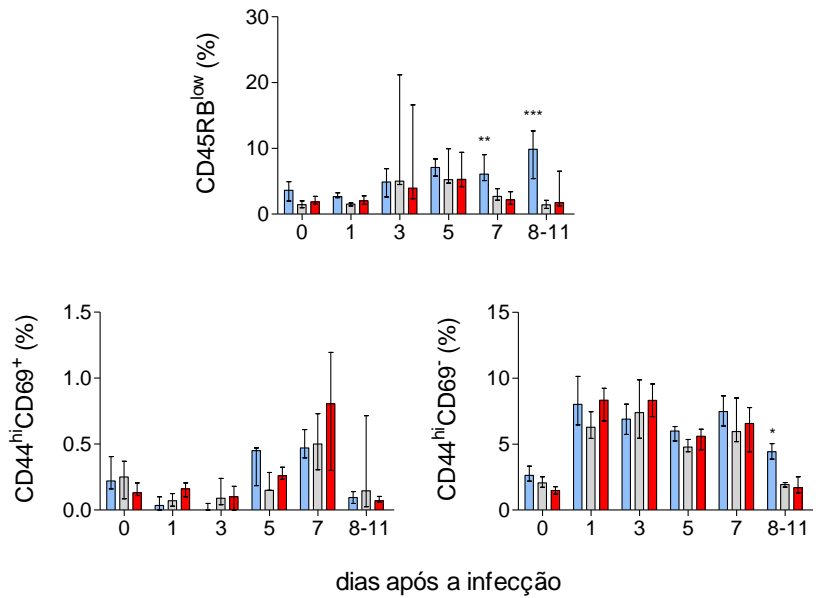
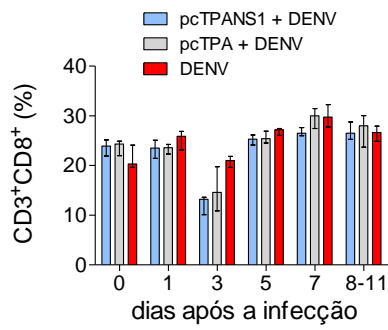


Figura 4.16. Ativação de células T esplênicas em camundongos BALB/c, previamente imunizados com pcTPANS1, na infecção com DENV2. Animais BALB/c (n de pelo menos 5 por grupo) foram previamente imunizados com pcTPANS1 e posteriormente desafiados com DENV2. Grupos controles não vacinados ou inoculados com o plasmídeo pcTPA também foram submetidos ao desafio. Os baços dos animais foram coletados nos pontos 0, 1, 3, 5, 7 e 8-11 dias após a infecção e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizando os marcadores anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB, anti-CD44 e anti-CD69. Valores expressos em mediana do percentual de subpopulações de (A) células TCD4⁺ e (B) células TCD8⁺. Diferenças significativas entre os grupos no mesmo dia de análise foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05; **p<0,01; e ***p<0,001. Dados representativos de três experimentos independentes.

No sangue, o percentual de células TCD4⁺ aumentou 24 h após o desafio com DENV em todos os grupos decaindo em seguida de forma acentuada nos pontos finais da cinética, a exceção do grupo dos animais vacinados, onde uma queda menos brusca no valor percentual foi observada, a qual se manteve significativamente maior em relação aos demais grupos. O percentual fenotípico da subpopulação de células TCD4⁺CD45RB^{low} presentes na circulação apresentou um aumento embora discreto e progressivo até o quinto dia da cinética, a partir do qual, apenas no grupo dos animais que receberam pcTPANS1 foi observado um aumento expressivo no percentual destas células no sétimo dia após a infecção. Nos pontos finais da cinética (8-11 dias), o percentual de células TCD4⁺CD45RB^{low} presentes no sangue dos animais vacinados decaiu expressivamente, entretanto, ainda manteve-se em níveis significativamente mais elevados em relação aos demais grupos não vacinados (Fig. 4.17 A).

Quanto aos níveis percentuais de células TCD8⁺ presentes no sangue dos grupos experimentais, observamos que no ponto 0 da cinética os animais vacinados apresentavam quantidade discretamente maior de células TCD8⁺ em relação aos grupos controles não imunizados. Este valor percentual decaiu 24 h após a infecção com DENV, voltando a aumentar após o sétimo dia do estudo, quando se manteve maior em relação aos controles. Com relação ao fenótipo de células TCD8⁺CD45RB^{low} vimos que o grupo dos animais que receberam pcTPANS1 apresentou percentuais significativamente maiores destas células, em relação aos controles não imunizados, a partir do quinto dia de infecção até os pontos finais do estudo de cinética (Fig. 4.17 B).

Dessa forma, observamos que no modelo animal empregado, durante a resposta imune ao antígeno NS1 expresso a partir da vacina pcTPANS1, células T ativadas sob distintos fenótipos podem estar correlacionadas com a resistência contra a infecção.

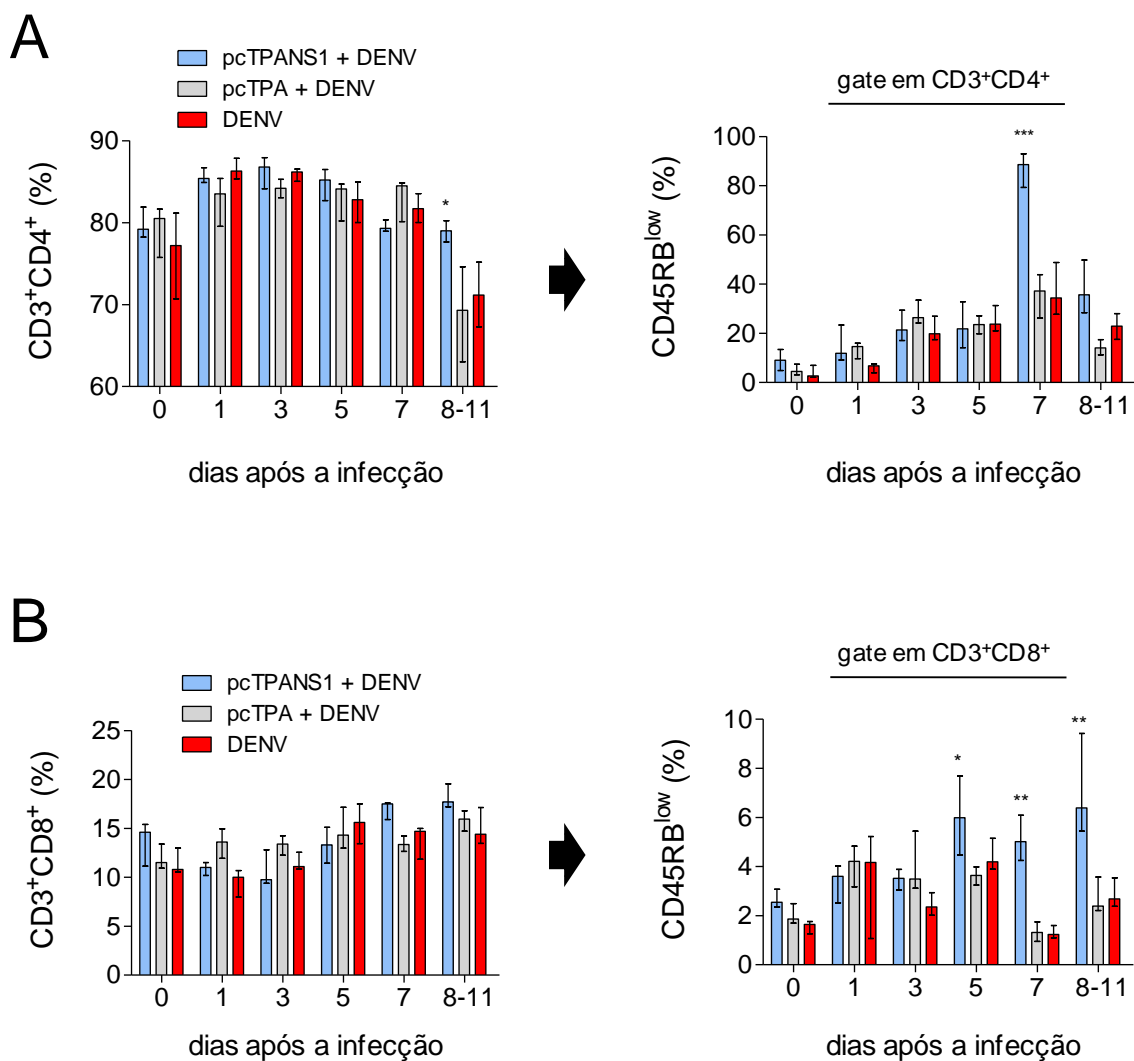


Figura 4.17. Ativação de células T sanguíneas em camundongos BALB/c, previamente imunizados com pcTPANS1, na infecção com DENV. Análise citométrica de amostras de sangue provenientes do estudo de cinética como descrito na legenda da Fig. 4.16. Valores expressos em mediana do percentual de subpopulações de (A) células TCD4⁺ e (B) células TCD8⁺. Diferenças significativas entre os grupos no mesmo dia de análise foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05; **p<0,01; e ***p<0,001. Dados representativos de três experimentos independentes.

4.3.2 Correlação entre morbidade induzida por DENV e subpopulações de células T em camundongos BALB/c previamente imunizados com pcTPANS1

Na etapa anterior, traçamos um panorama geral entre fenótipos de ativação de células T ($CD45RB^{low}$, $CD44^{hi}CD69^{+}$ e $CD44^{hi}CD69^{-}$) no curso da infecção com DENV no modelo animal empregado. Entretanto, do sétimo dia de infecção em diante, é o momento quando começam a ocorrer manifestações de morbidades relacionadas ao comprometimento do sistema nervoso central, tais como paralisias e alterações da coluna cervical. Sendo assim, procedemos com uma abordagem analítica visando correlacionar esta manifestação clínica em decorrência da infecção com o fenótipo de células T, induzido ou não pela imunização com pcTPANS1. Para isso, novos experimentos foram efetuados considerando amostras provenientes de diversos sítios (baço, sangue, fígado e cérebro) a partir do sétimo dia de infecção. No momento do sacrifício os animais foram classificados entre (i) sintomáticos (camundongos não vacinados portando paralisia uni ou bilateral dos membros posteriores e/ou alterações da coluna cervical); (ii) não sintomáticos (camundongos não vacinados sem qualquer sintoma aparente); (iii) vacinados (animais que receberam a vacina pcTPANS1e não apresentam morbidade). O grupo de animais não vacinados incluiu os camundongos não imunizados e os que receberam somente o plasmídeo controle pcTPA.

Após esta compilação, vimos que o baço dos animais vacinados com pcTPANS1 apresentou quantidade percentual maior de células $TCD4^{+}$ e suas subpopulações ativadas ($CD45RB^{low}$, $CD44^{hi}CD69^{+}$ e $CD44^{hi}CD69^{-}$) em relação aos animais portadores de sintomatologia (Figura 4.18 A). Em contrapartida, o tecido esplênico dos animais sintomáticos apresentou percentual maior de células $TCD8^{+}$ em comparação aos animais vacinados. Apesar desta maior quantidade de células $TCD8^{+}$, observamos que neste grupo os percentuais fenotípicos das subpopulações $TCD8^{+}CD45RB^{low}$ e $TCD8^{+}CD44^{hi}CD69^{-}$ mostraram-se mais reduzidos quando comparados aos animais vacinados (Figura 4.18 B). Vale ressaltar que em algumas situações, o grupo de animais não vacinados que não apresentavam sintomas aparentes mostrou um

comportamento fenotípico mais próximo ao do grupo dos animais vacinados, como no caso das células $\text{TC4}^+\text{CD45RB}^{\text{low}}$, $\text{TC8}^+\text{CD45RB}^{\text{low}}$ e $\text{TC8}^+\text{CD44}^{\text{hi}}\text{CD69}^-$, cujos percentuais se mantiveram maiores em relação aos animais que apresentavam sintomatologia, apesar de mais baixos em relação ao detectado nos camundongos vacinados, exceto para o fenótipo $\text{TC8}^+\text{CD44}^{\text{hi}}\text{CD69}^-$ (Figura 4.18 A e B).

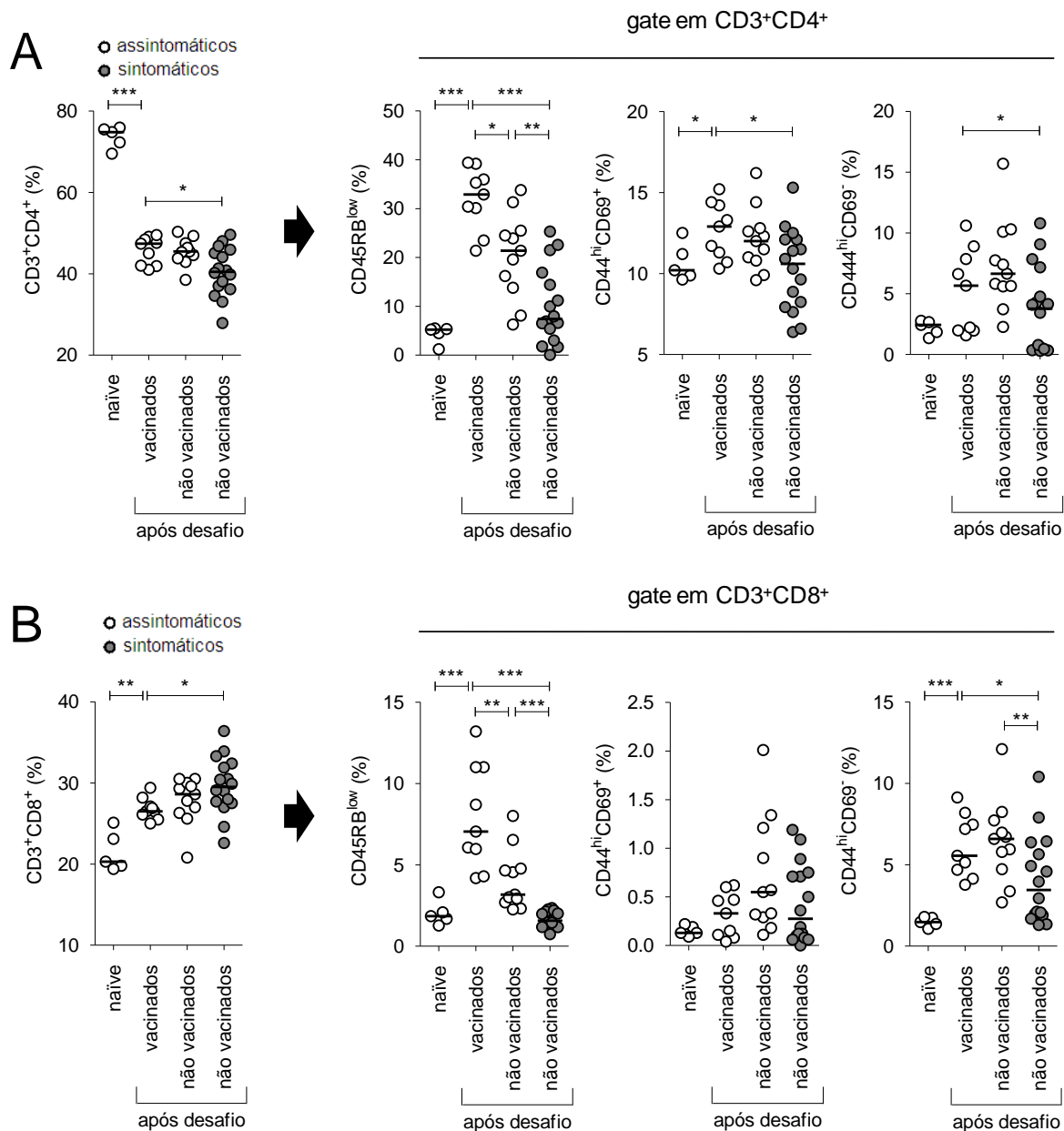


Figura 4.18. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no baço de animais imunizados ou não com pCTPANS1. Esplenócitos isolados de camundongos BALB/c imunizados ou não com pCTPANS1 desafiados com DENV2 foram imunofenotipados por citometria de fluxo e correlacionados com a morbidade dos animais. Amostras foram coletadas a partir do sétimo dia de infecção, a partir do qual se iniciam os sintomas de comprometimento do SNC. Valores expressos em percentuais com mediana. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos independentes (naïve $n = 5$; vacinados $n = 9$; não vacinados assintomáticos $n = 11$; não vacinados sintomáticos $n = 16$).

No sangue, observamos que o percentual de células TCD4⁺ nos animais protegidos pela vacina pcTPANS1 não diferiu estatisticamente em relação aos grupos não vacinados (DENV e pcTPA + DENV), entretanto, dentre os animais não vacinados, aqueles que apresentaram sintomatologia mostraram menor percentual desta população linfocitária. Para o percentual do subgrupo de células TCD4⁺CD45RB^{low}, observamos um comportamento semelhante ao ocorrido no tecido esplênico, onde os animais vacinados apresentaram quantidades dramaticamente maiores deste fenótipo em relação aos portadores de sintomas, enquanto que nos animais não vacinados e assintomáticos esse aumento se deu de maneira menos dramática (Figura 4.19 A). Observamos também que os animais protegidos pela vacina pcTPANS1 apresentam percentuais de células TCD8⁺ e TCD8⁺CD45RB^{low} relevantemente maiores em relação aos grupos não vacinados (sintomáticos ou não) (Figura 4.19 B).

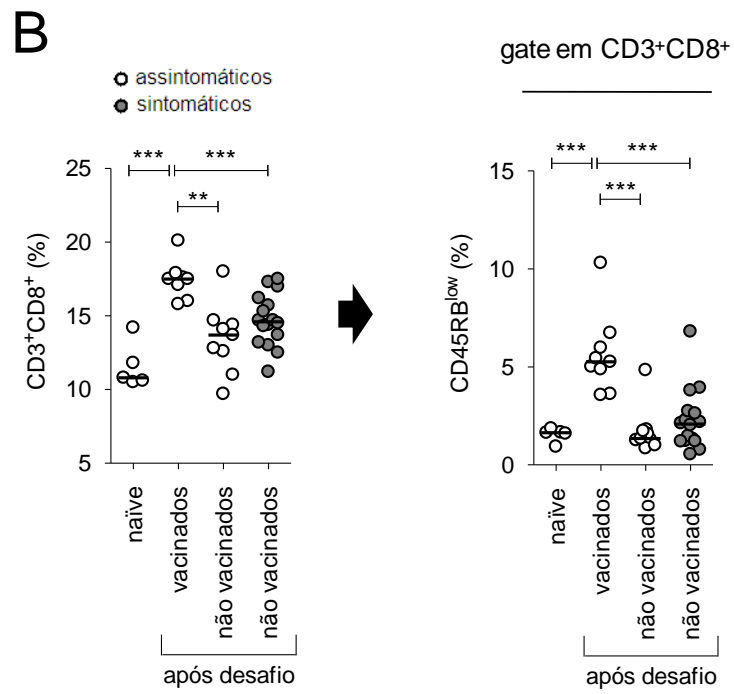
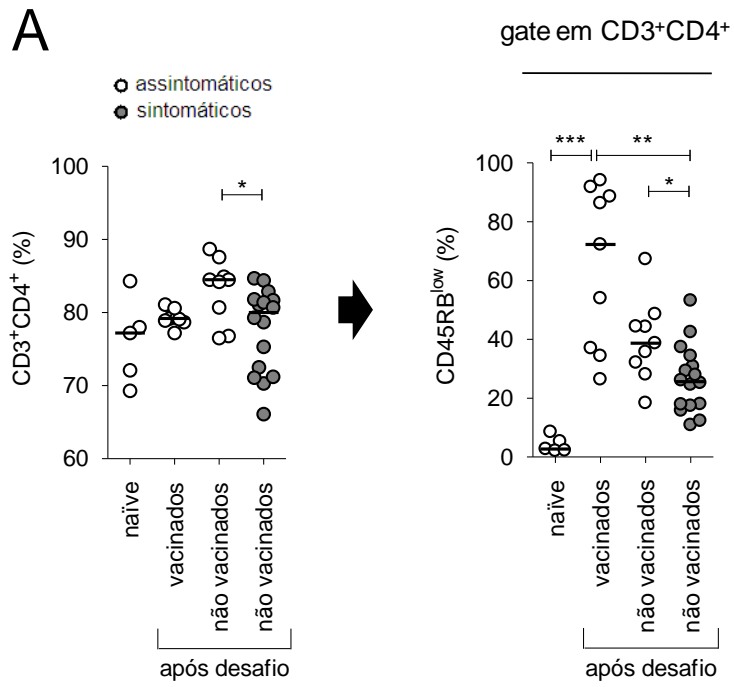
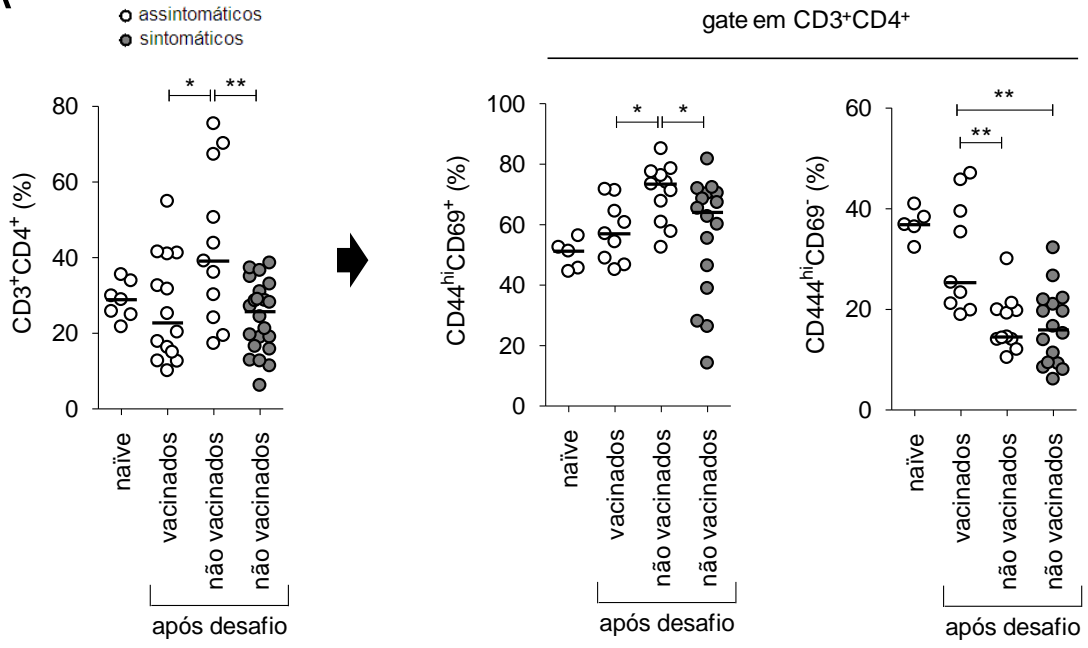


Figura 4.19. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no sangue de animais imunizados ou não com pcTPANS1. Amostras de sangue de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 foram imunofenotipados por citometria de fluxo e correlacionados com a morbidade dos animais. Amostras foram coletadas a partir do sétimo dia de infecção, a partir do qual se iniciam os sintomas de comprometimento do SNC. Valores expressos em percentuais com mediana. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos independentes (naive $n=5$; vacinados $n=9$; não vacinados assintomáticos $n=9$; não vacinados sintomáticos $n=16$).

Na avaliação do tecido hepático considerando a abordagem de correlação entre as populações linfocitárias e o estado sintomatológico dos animais estudados, investigamos populações de células T com fenótipos $CD44^{hi}CD69^{+}$ e $CD44^{hi}CD69^{-}$. Os animais vacinados com pcTPANS1 exibiram níveis percentuais de células $TCD4^{+}$ semelhantes aos animais não vacinados e sintomáticos, entretanto, os animais não vacinados e assintomáticos foram os que apresentaram os maiores de níveis destas células. O percentual do fenótipo $TCD4^{+}CD44^{hi}CD69^{+}$ também se mostrou maior nos animais não vacinados e assintomáticos em relação aos demais grupos, porém, os níveis de $TCD4^{+}CD44^{hi}CD69^{-}$ se mostraram aumentados no tecido hepático dos animais vacinados em relação aos animais que não foram imunizados (sintomáticos ou não) (Figura 4.20 A). Quanto ao percentual de células $TCD8^{+}$ neste órgão, não encontramos variações entre os grupos vacinados ou não vacinados após o desafio com DENV, entretanto, o valor percentual referente ao fenótipo $TCD8^{+}CD44^{hi}CD69^{-}$ dos grupos desafiados foi significativamente inferior ao detectado nos animais naïve, sendo que os animais sintomáticos mantiveram níveis ainda menores para este fenótipo do que os assintomáticos. O percentual de células $TCD8^{+}CD44^{hi}CD69^{+}$ não diferiu significativamente entre os grupos, porém, os animais assintomáticos que não receberam a vacina pcTPANS1 apresentaram níveis maiores desta subpopulação linfocitária.

A



B

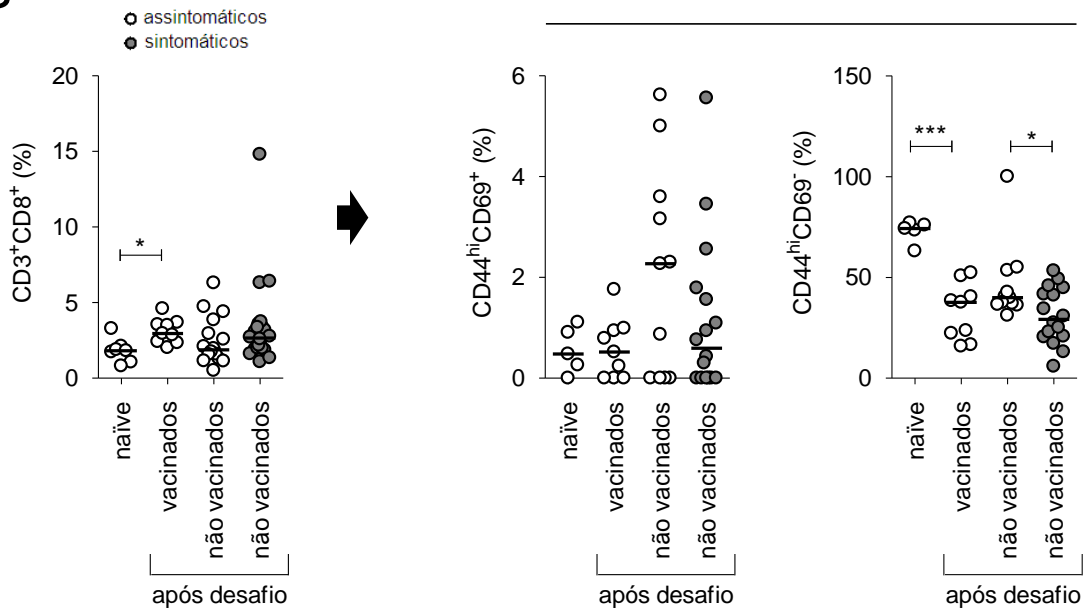


Figura 4.20. Correlação entre a manifestação de morbidade e fenótipos de células T presentes no fígado de animais imunizados ou não com pcTPANS1. Linfócitos isolados do fígado (por gradiente de densidade) de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1 desafiados com DENV2 foram imunofenotipados por citometria de fluxo e correlacionados com a morbidade dos animais. Amostras foram coletadas a partir do sétimo dia de infecção, a partir do qual se iniciam o surgimento dos sintomas de comprometimento do SNC. Valores expressos em percentuais com mediana. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos independentes (naïve $n=7$; vacinados $n=14$; não vacinados assintomáticos $n=11$; não vacinados sintomáticos $n=22$).

Um protocolo de isolamento de linfócitos provenientes de amostras de cérebro foi executado, de modo semelhante ao descrito no item 4.1.4, para investigar a presença de infiltrado celular no órgão após a infecção. Por citometria de fluxo, identificamos a presença significativa de infiltrado linfocitário (caracterizado pela morfologia e pela expressão de CD4 ou CD8) no período de 8-11 dias após o desafio com DENV. Nas amostras cerebrais provenientes dos animais não desafiados (naïve) ou dos animais sacrificados três dias após a infecção não foi possível detectar a presença destas células (Figura 4.21).

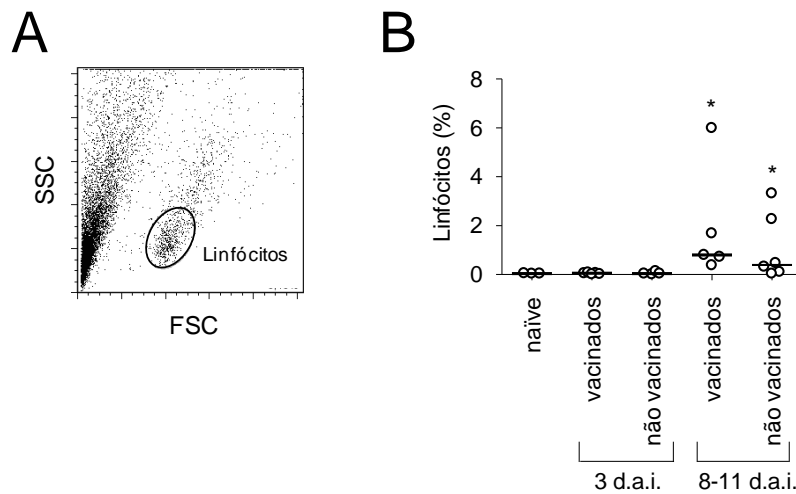


Figura 4.21. Infiltrado celular isolado a partir do cérebro de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 após o desafio com DENV2. (A) Representação citométrica de dispersão de pontos com parâmetros morfológicos (FSC e SSC) exibindo linfócitos isolados do cérebro de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1 e desafiados com DENV2. (B) Quantificação do infiltrado celular obtido a partir dos cérebros de camundongos infectados. Amostras de animais não vacinados coletadas no período de 8-11 dias após a infecção são provenientes de animais com morbidades relacionadas ao comprometimento do SNC. Valores expressos em percentuais com mediana. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney utilizando o grupo não infectado (*naïve*) como referência. * $p < 0,05$.

Nesta análise, em apenas 2/6 animais para cada grupo (vacinação e não vacinação) conseguimos quantidade suficiente de eventos para investigar o possível envolvimento de células T efetoras induzidas pela imunização, considerando os marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB, anti-CD44 e anti-CD62L. Durante a análise citométrica, consideramos os eventos compreendidos na região de linfócitos (Figura 4.21 A) para delimitar células CD4⁺ e CD8⁺. A abordagem de análise do fenótipo efetor CD44^{hi}CD62L⁻ procedeu-se como em 4.1.3, e neste caso, como foi possível identificar um pico bem definido para o fenótipo CD45RB^{low} nas populações de células T, posicionamos o marcador analítico de maneira convencional (Figura 4.22).

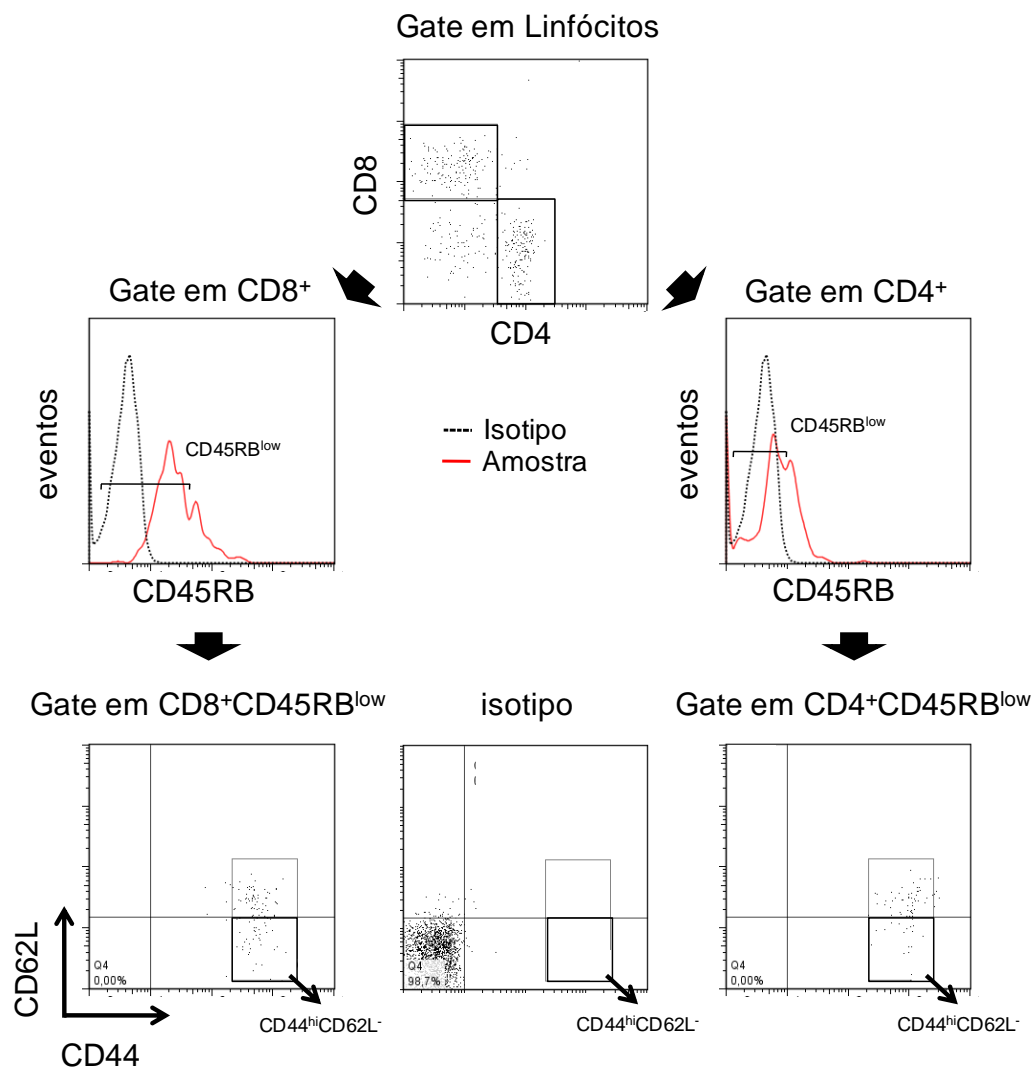


Figura 4.22. Estratégia de análise citométrica para infiltrados linfocitários cerebrais provenientes de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1. Considerando a região de linfócitos anteriormente citada como mostra a figura 4.21, os eventos CD4⁺ e CD8⁺ foram demarcados. Eventos CD45RB^{low} foram analisados considerando os eventos CD4⁺ ou CD8⁺ e, subsequentemente, os eventos compreendidos nestas regiões (CD4⁺CD45RB^{low} ou CD8⁺CD45RB^{low}) foram avaliados quanto ao fenótipo efetor CD44^{hi}CD62L⁻.

Foi observado que os animais vacinados apresentaram percentuais maiores de células CD4⁺ e CD8⁺ nestes infiltrados em relação aos animais desafiados que não receberam a imunização com DNA (todos com sintomas de comprometimento do SNC). Também foi constatado que o percentual de células CD8⁺CD45RB^{low} e CD8⁺CD45RB^{low}CD44^{hi}CD62L⁻ se mostrou maior nos animais vacinados em relação aos não vacinados. Os animais vacinados também apresentaram quantidades percentuais maiores de células CD4⁺CD45RB^{low} nos infiltrados, entretanto, o percentual fenotípico de células CD4⁺CD45RB^{low}CD44^{hi}CD62L⁻ não diferiu entre os grupos (Figura 4.23 A e B).

Sendo assim, constatamos que não apenas a resposta imune adaptativa promovida pelo antígeno NS1 expresso a partir da vacina pcTPANS1 é capaz de induzir evidente ativação de células T frente os fenótipos abordados (CD45RB^{low}, CD44^{hi}CD69⁺, CD44^{hi}CD69⁻ e CD44^{hi}CD62L⁻), mas também, esta parece atuar localmente, podendo estar diretamente correlacionada com a resistência à infecção e ao surgimento dos sintomas de comprometimento do SNC.

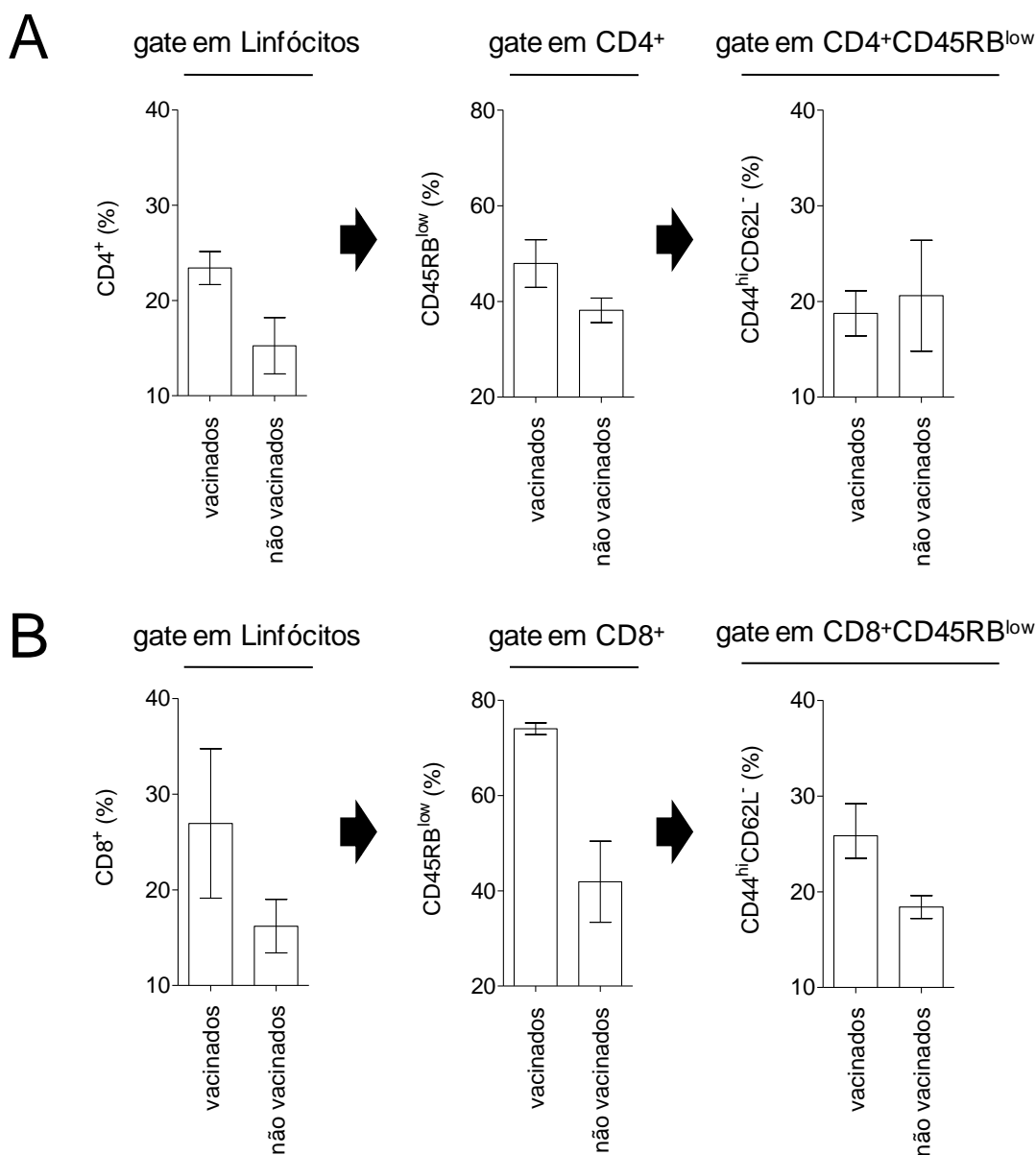


Figura 4.23. Fenotipagem de células T presentes no cérebro de animais imunizados ou não com pcTPANS1. Linfócitos isolados do cérebro de camundongos BALB/c imunizados ou não com pcTPANS1 desafiados com DENV2 foram imunofenotipados por citometria de fluxo. Subpopulações de células CD4⁺ (CD4⁺CD45RB^{low} e CD4⁺CD45RB^{low}CD44^{hi}CD62L⁻) (**A**) ou CD8⁺ (CD8⁺CD45RB^{low} e CD8⁺CD45RB^{low}CD44^{hi}CD62L⁻) (**B**) presentes nos infiltrados. Amostras foram coletadas entre 8 e 11 dias a partir da infecção. Camundongos não vacinados representam animais com morbidades relacionadas ao comprometimento do SNC tais como paralisias e alterações da coluna cervical. Valores expressos em percentuais com mediana.

4.3.3 Migração e proliferação linfocitária induzida na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1

Para aprofundar a investigação da participação de células T na resposta imune adaptativa induzida pela imunização com pcTPANS1, foi realizado um ensaio de transferência de células utilizando CFSE para avaliar migração e proliferação linfocitária pós-desafio induzidas pela vacinação. Para isto, esplenócitos de camundongos BALB/c não vacinados ou vacinados com pcTPANS1 (duas doses por via i.m. com intervalo de duas semanas) foram submetidos a um procedimento de enriquecimento de células T e posteriormente marcados com CFSE. A suspensão celular resultante foi introduzida em outros grupos de camundongos BALB/c pela via i.v. após quatro dias de infecção com DENV2. Dessa forma, o grupo que recebeu as células isoladas dos animais vacinados foi referido como grupo DENV CFSE_{vac} e o grupo controle que recebeu os esplenócitos isolados a partir de animais não vacinados foi denominado grupo DENV CFSE_{não vac}. Três dias após o inóculo da suspensão celular (total de sete dias de infecção) os animais recipientes foram sacrificados e o baço, sangue, fígado, cérebro e medula óssea (femoral) foram processados em *pool* para análise citométrica utilizando conjuntamente anticorpos anti-CD4 e anti-CD8.

O processamento do inóculo (enriquecimento e marcação com CFSE) foi averiguado por citometria de fluxo utilizando (i) anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 antes da marcação com CFSE; e (ii) anti-CD4 e anti-CD8 após marcação com CFSE. Nos esplenócitos obtidos de animais não vacinados ou que receberam pcTPANS1 (amostra bruta), após procedimento de enriquecimento em coluna de lã de nylon para retirada de células B, foi observado um aumento médio de 84,7 % das células CD3⁺, com acréscimos médios de 83 % de células CD8⁺ e de 73 % de CD4⁺ (Figura 4.24 A e B). As células marcadas com CFSE (inóculo final) apresentaram média de 12,6 % e 55,6 % de células CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente (Figura 4.24 C).

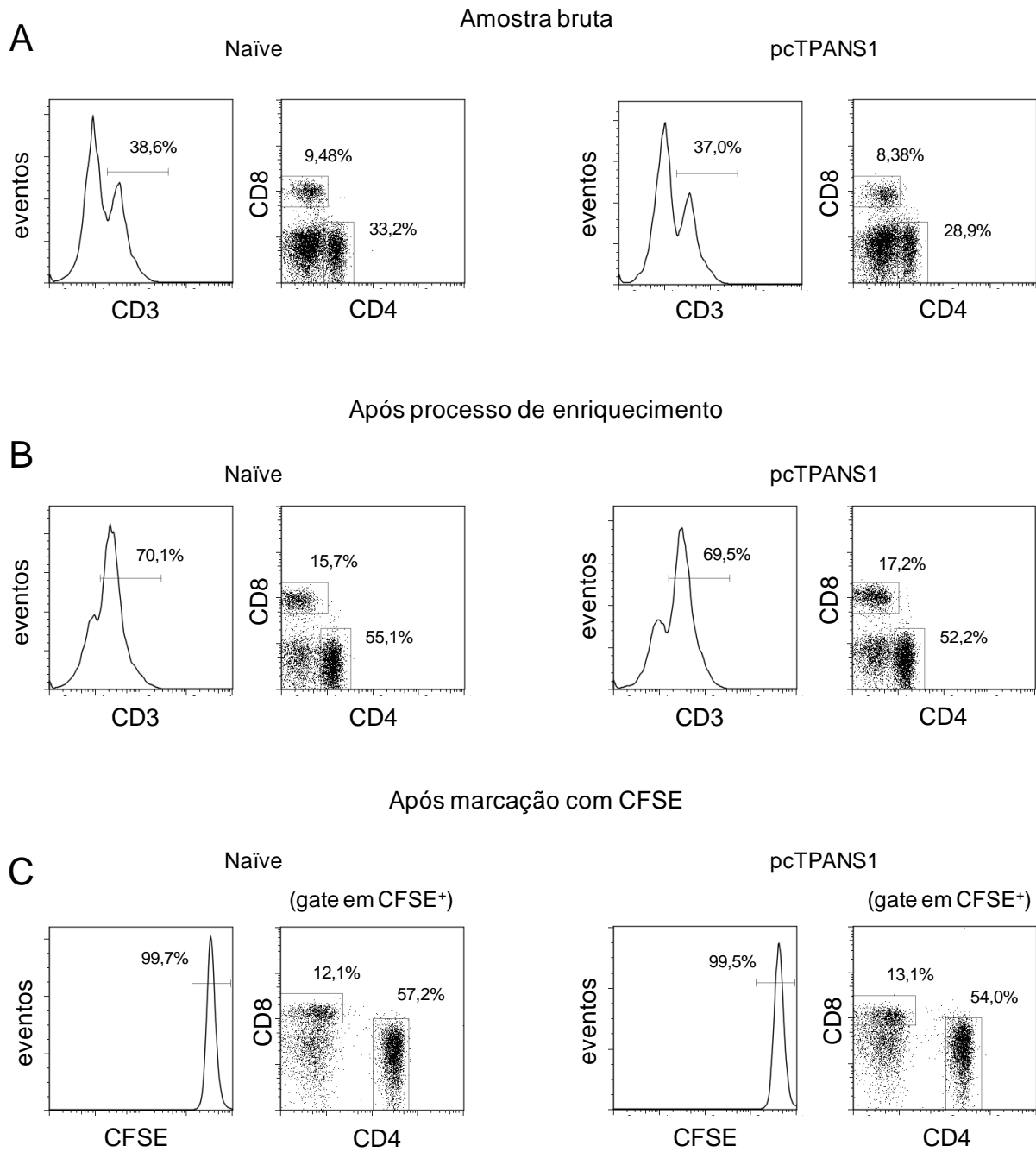


Figura 4.24. Avaliação das amostras marcadas com CFSE utilizadas na transferência de células. *Pool* de esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c (n = 5 por grupo) não estimulados (naïves) ou vacinados com pcTPANS1 (duas doses por via i.m.) foram submetidos ao enriquecimento de células T mediante processamento em coluna de lã de nylon. Análises citométricas foram efetuadas antes (amostra bruta) e depois do enriquecimento utilizando os marcadores anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, conjuntamente. Em seguida as suspensões enriquecidas de células T foram marcadas com CFSE e também avaliadas por citometria utilizando em conjunto anti-CD4 e anti-CD8. A figura representa as suspensões de esplenócitos (obtidos de animais naïves ou vacinados com pcTPANS1) na forma de histograma evidenciando o percentual de células CD3⁺, e na forma de *dot plot* mostrando os eventos CD4⁺ e CD8⁺ (**A**) antes e (**B**) depois do processo de enriquecimento. Em **C** são evidenciadas características (alta intensidade de fluorescência do CFSE e percentuais de CD4⁺ e CD8⁺) das suspensões enriquecidas após o procedimento de marcação utilizadas para a transferência de células.

A Figura 4.25 exhibe os aspectos populacionais das amostras oriundas dos animais recipientes após o processamento e análise por citometria de fluxo nos diferentes sítios (baço, sangue, fígado, cérebro e medula óssea femoral). A coluna A mostra uma região mãe R1 situada em parâmetros morfológicos (FSC x SSC) contendo os eventos considerados na análise. A coluna B exhibe uma região contendo os eventos CFSE⁺ recuperados, enquanto que na coluna C está representada uma região considerada de proliferação (CFSE^{low}). Em D é exibido o percentual de célula T (CD4⁺ ou CD8⁺) contidas na região de proliferação quando a leitura foi possível.

Com exceção do fígado, em todos os outros sítios avaliados (baço, sangue, cérebro e medula óssea) do grupo DENV CFSE_{vac} foi possível recuperar um percentual maior do inoculo de células CFSE⁺, quando comparado ao percentual recuperado no grupo controle DENV CFSE_{não vac} (coluna B). No baço dos animais DENV CFSE_{vac}, foi observado 5,09 % de células CFSE⁺ enquanto que no grupo DENV CFSE_{não vac} foi encontrado 2,91 %. Considerando os eventos CFSE⁺ recuperados neste órgão, 5,10 % sofreu proliferação no grupo DENV CFSE_{vac}, sendo este representado por células CD4⁺ e CD8⁺, enquanto que no grupo controle DENV CFSE_{não vac} foi encontrado menor percentual de proliferação (3,30 %) representado somente por células CD4⁺, não sendo detectadas células CD8⁺.

Na circulação sanguínea, aproximadamente o dobro de células CFSE⁺ foi recuperado no grupo DENV CFSE_{vac} em relação ao grupo DENV CFSE_{não vac}. Dentre as células CFSE⁺, no grupo DENV CFSE_{vac} 4,02 % passaram por processo de proliferação (51,2 % CD4⁺ e 10,7 % CD8⁺) enquanto que no grupo controle foi observada uma quantidade ínfima de eventos CFSE^{low} (0,25 %).

A partir do tecido hepático dos recipientes, foi recuperada uma quantidade maior de células CFSE⁺ (2,09 %) no grupo DENV CFSE_{não vac} em relação ao grupo DENV CFSE_{vac} (0,45 %). Apesar desta discrepância, no grupo DENV CFSE_{vac} observou-se 23,1 % (28,9 % CD4⁺ e 8,89 % CD8⁺) de células que passaram por processo de proliferação (CFSE^{low}) enquanto que apenas 1,25 % (42,6 % CD4⁺ e 1,85 % CD8⁺) foi detectado no grupo controle.

No cérebro, foi observado 1,92 % de células CFSE⁺ recuperadas a partir do grupo DENV CFSE_{vac}, em contraste com 0,53 % no grupo DENV CFSE_{não vac}. Neste órgão, em nenhum dos grupos foi evidenciada população CFSE^{low}.

No lavado medular femoral dos animais recipientes, foi encontrado 0,45 % de células CFSE⁺ no grupo DENV CFSE_{vac}, enquanto que apenas 0,23 % foi detectado nos animais do grupo DENV CFSE_{não vac}. Somente no grupo DENV CFSE_{vac} foi evidenciada população CFSE^{low}, sendo apenas a minoria dela representada por eventos CD4⁺ (8,51%) e CD8⁺ (4,26 %) (Figura 4.25).

Desta forma, o ensaio de transferência de células evidenciou de uma maneira alternativa a participação de células T na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1 expresso a partir da vacina pcTPANS1 através da indução de proliferação e direcionamento de clones, provavelmente específicos, à periferia. Além disso, o ensaio também caracterizou a participação precoce de células CD4⁺ no tecido esplênico em uma resposta primária à infecção com DENV2, quando analisamos as células provenientes de animais não vacinados.

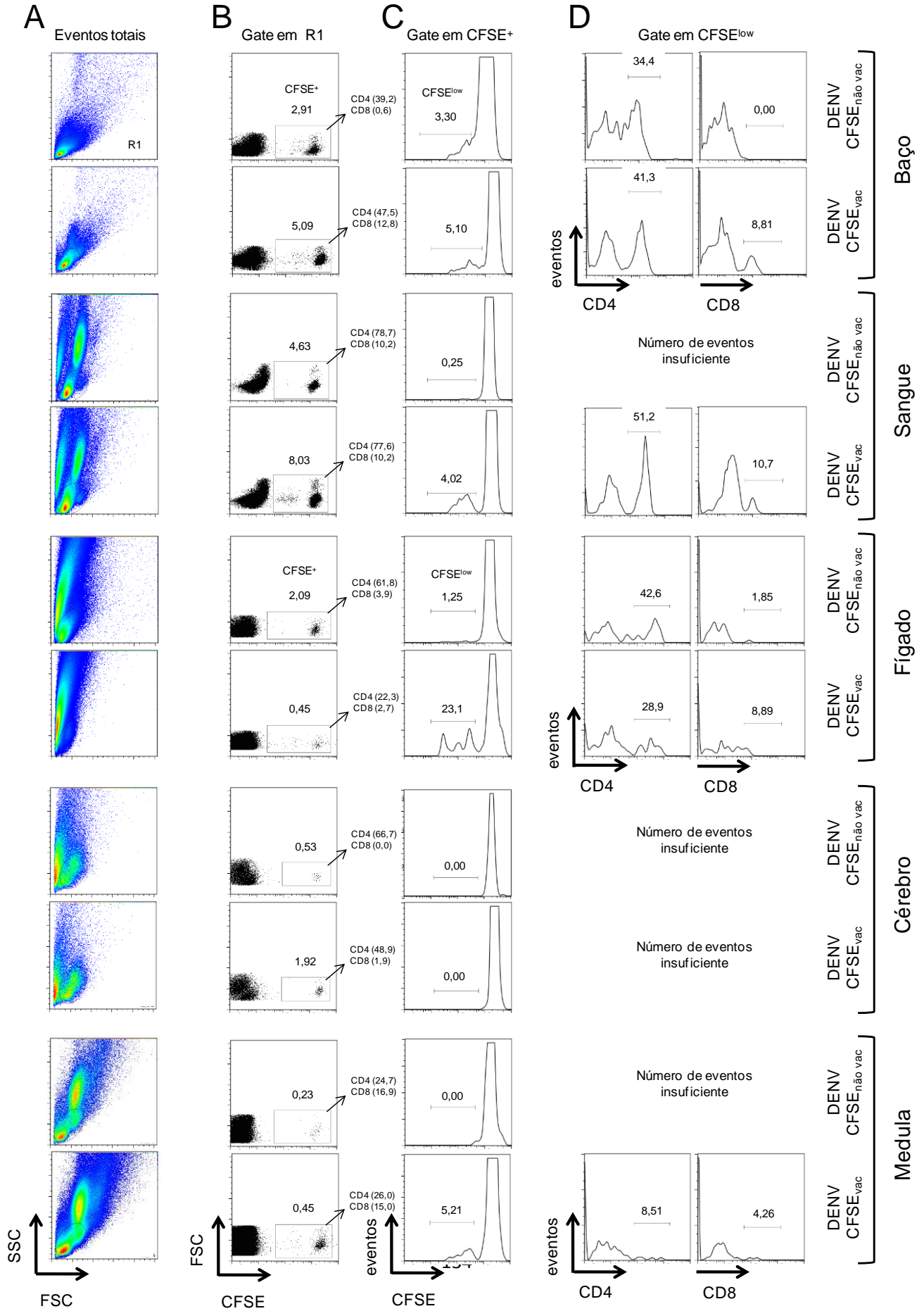


Figura 4.25. Ensaio de migração e proliferação linfocitária em decorrência do estímulo com pcTPANS1 frente ao desafio com DENV. Esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c não vacinados (n=5) ou vacinados com pcTPANS1 (n=5) foram submetidos ao enriquecimento de células T e posteriormente marcados com CFSE. Em seguida estas suspensões celulares (inoculo) foram transferidas para outros camundongos BALB/c (n=5 por grupo) os quais haviam sido desafiados com DENV2 por via i.c. com quatro dias de antecedência. Três dias após a transferência de células (total de sete dias de infecção), os animais foram sacrificados e o baço, sangue, fígado, cérebro e medula óssea femoral foram analisados, em pool, por citometria quanto à presença de células CFSE⁺, sendo neste momento feita marcação adicional com anti-CD4 e anti-CD8. **(A)** Representação em densidade de dispersão de pontos (*density plot*) dos eventos totais dos diversos sítios estudados, evidenciando a região mãe de análise (R1) demarcada sob parâmetros morfológicos de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **(B)** Perfil de dispersão de pontos (*dot plot*) dos eventos compreendidos em R1 onde se exibe uma região (CFSE⁺), que representa as células recuperadas a partir da suspensão celular utilizada na transferência, indicando: o percentual de células CFSE⁺ e o percentual de eventos CD4⁺ e CD8⁺ compreendidos nos eventos CFSE⁺. Esta representação foi normalizada pra 50000 eventos no baço e sangue e 10000 eventos para os demais sítios (fígado, cérebro e medula femoral). **(C)** Histograma citométrico considerando os eventos CFSE⁺ evidenciando uma região CFSE^{low} (região de proliferação) com valores percentuais. **(D)** Avaliação de células CD4⁺ e CD8⁺, com valores percentuais, na região de proliferação quando a leitura foi possível. DENV CFSE_{vac} – grupo desafiado com DENV que recebeu suspensão de esplenócitos provenientes de animais vacinados com pcTPANS1 enriquecida de células T e marcada com CFSE; DENV CFSE_{não vac} – grupo desafiado com DENV que recebeu suspensão de esplenócitos provenientes de animais não vacinados enriquecida de células T e marcada com CFSE (grupo controle).

4.3.4 Perfil de citocinas induzido na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1

Seguindo a abordagem de comparação entre os grupos sintomáticos e assintomáticos após o desafio com DENV2 por via i.c. (com o foco a partir do sétimo dia de infecção), foi investigada a participação de citocinas relacionadas à inflamação (IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, MCP-1, IL-10 e IL-6) presentes no soro dos camundongos vacinados ou não com pcTPANS1. Não foram detectadas diferenças significativas entre os níveis destas citocinas presentes entre amostras de animais não vacinados, com ou sem os sinais clínicos da infecção. De um modo geral, os animais vacinados e desafiados apresentaram níveis das citocinas estudadas semelhantes aos detectados nos animais controles não infectados, exceto para IL-12p70. Por outro lado, os animais infectados não imunizados com pcTPANS1 apresentaram níveis aumentados de IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10 em relação ao grupo controle não infectado (camundongos naïve). Desta forma, durante a resposta imune estimulada pelo antígeno NS1 expresso a partir da vacina pcTPANS1, observamos que, de uma maneira geral, os níveis plasmáticos de citocinas relacionadas à inflamação são inferiores em relação aos animais desprotegidos.

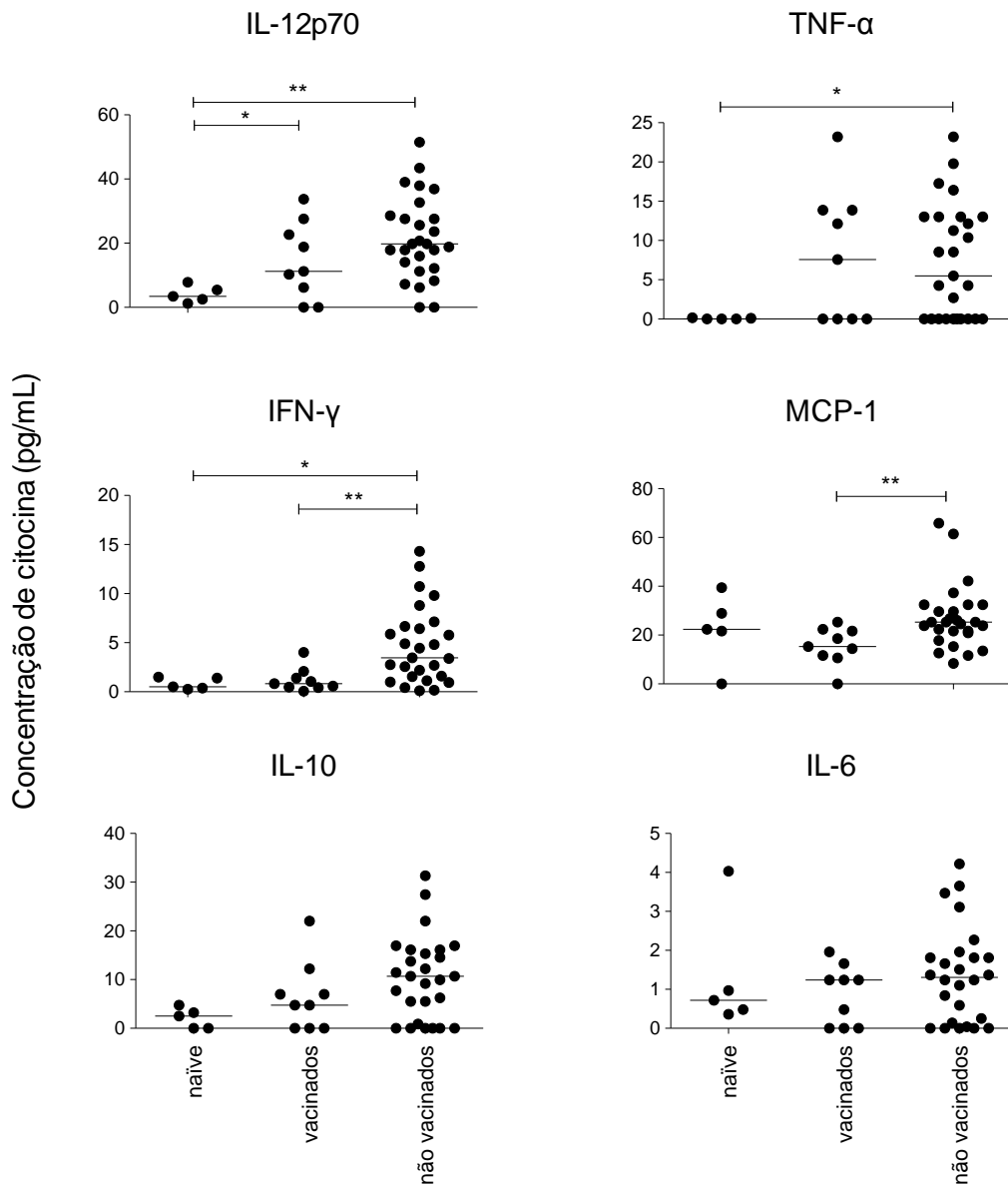


Figura 4.26. Perfil de citocinas circulantes em camundongos imunizados ou não com pcTPANS1 após desafio com DENV. Amostras de plasma de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 por via i.m. e posteriormente infectados com DENV2 por via i.c., foram coletadas a partir do sétimo dia de infecção e testadas quanto à presença de IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6. A quantificação foi feita mediante técnica multiplex de detecção CBA (*cytometric bead array*). Valores representados individualmente em pg/mL com mediana. Asterísticos representam diferença significativa entre os grupos, utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;).

4.3.5 Investigação da vertente humoral na imunidade adaptativa ao antígeno NS1 induzida pela vacina pcTPANS1

A resposta imune humoral promovida pela vacinação com pcTPANS1 foi investigada no curso da infecção com DENV2 mediante fenotipagem utilizando o marcador B220 (CD45R), e pela detecção de anticorpos séricos IgG anti-NS1. O marcador B220 é uma das isoformas do CD45 que é expresso predominantemente na superfície dos linfócitos B em vários estágios de diferenciação e, dentre outras moléculas, é amplamente utilizado como um marcador de célula B. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados ou não com a vacina pcTPANS1, sendo também utilizado um grupo controle no qual foi inoculado o plasmídeo pcTPA. Todos os grupos foram desafiados com DENV2 por via i.c. e nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 8-11 o baço e o sangue dos animais foram processados para ensaios de citometria de fluxo utilizando o marcador anti-B220.

Nas amostras de baço não foram detectadas diferenças significativas no percentual de células B220⁺ ao longo da cinética da infecção. Por outro lado, observamos que no dia seguinte após a introdução do vírus, houve redução do percentual deste fenótipo nas amostras de sangue em todos os grupos, sendo que o nível destas células voltou a aumentar entre o terceiro e quinto dia após a infecção nos grupos não vacinados (DENV e pcTPA + DENV). Os animais vacinados apenas apresentaram os percentuais destas células aumentados no sangue a partir do sétimo dia de infecção, mantendo esses níveis mais elevados em comparação aos outros grupos até o final do experimento (Figura 4.27 A).

A partir do sétimo dia de infecção, momento quando se inicia o aparecimento de morbidades, os dados foram separados em grupos de animais sintomáticos e assintomáticos para verificar uma associação entre o percentual e células B220⁺ nos tecidos estudados e a condição clínica do animal. Após esta compilação, foi observado que no baço, o percentual de células B220⁺ no grupo dos animais vacinados foi significativamente maior em relação ao observado nos animais não vacinados que apresentaram os sintomas. Vale ressaltar que os animais não vacinados

assintomáticos também apresentaram percentuais esplênicos de células B220⁺ significativamente maiores em relação aos animais sintomáticos. Na circulação sanguínea, o percentual de células B220⁺ se mostrou significativamente maior em relação aos animais não vacinados, sintomáticos ou não (Figura 4.27 B).

A determinação de anticorpos IgG anti-NS1 no plasma dos animais vacinados ou não, foi feita nos pontos 0, 3 e 8-11 após o desafio com DENV2 por via i.c. Como esperado, somente os animais apenas vacinados com pcTPANS1 (antes do desafio) apresentaram títulos de anticorpos IgG anti-NS1 (aproximadamente 1/2000). Três dias após o desafio, estes níveis aumentaram para aproximadamente 1/5000 e no período de 8-11 dias após a infecção foi detectado um aumento dos títulos de aproximadamente 6x do observado no terceiro dia. Já nos animais apenas desafiados, não foi possível detectar anticorpos anti-NS1 no terceiro dia após a infecção, porém níveis discretos (aproximadamente 1/700) destes anticorpos foram observados no período de 8-11 dias após a infecção (Figura 4.27 C).

Em suma, observamos a participação da resposta humoral induzida pela vacinação com pcTPANS1 com uma rápida amplificação da produção de anticorpos característica da imunidade adaptativa, corroborando com os percentuais aumentados de células B220⁺ no baço e no sangue em relação aos animais desprotegidos.

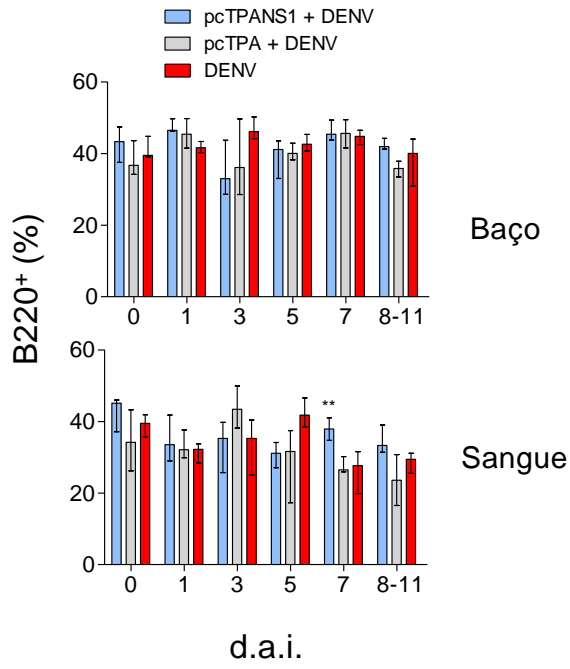
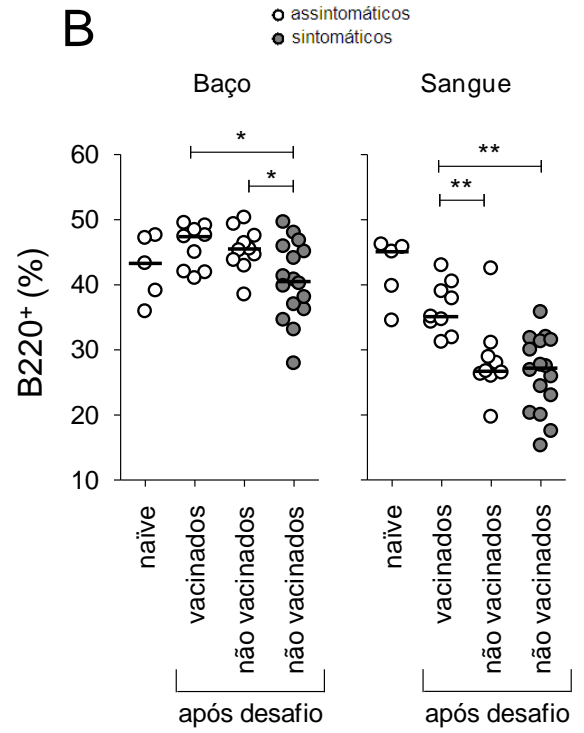
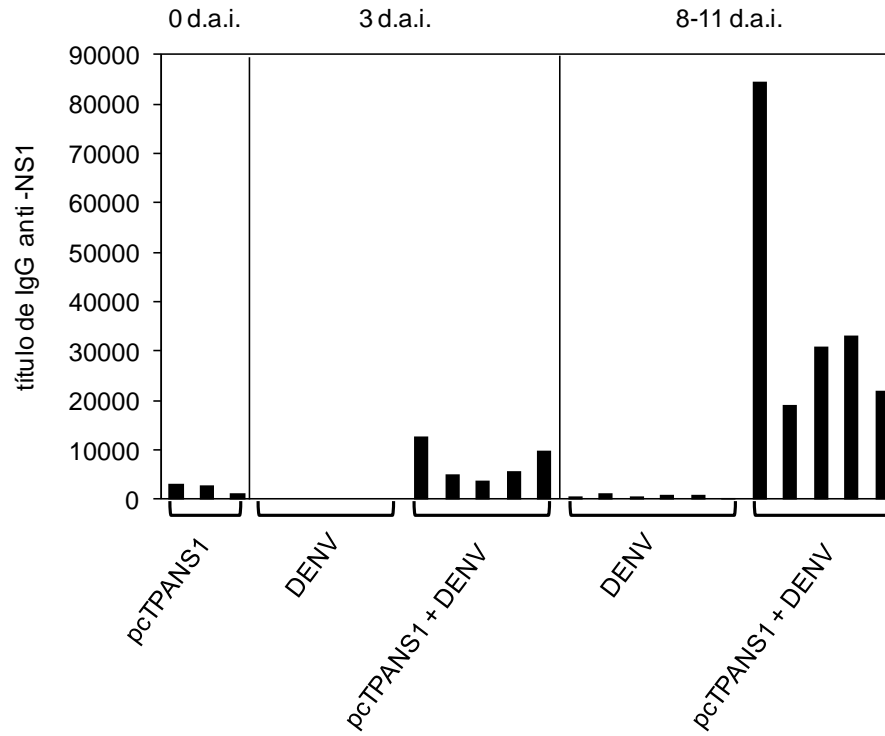
A**B****C**

Figura 4.27. Participação da resposta humoral em camundongos BALB/c na imunidade adaptativa induzida pelo antígeno NS1. (A) Animais BALB/c foram previamente imunizados com pcTPANS1 e posteriormente desafiados com DENV2. Grupos controles não vacinados ou inoculados com o plasmídeo pcTPA também foram submetidos ao desafio. O baço e o sangue dos animais foram coletados nos pontos 0, 1, 3, 5, 7 e 8-11 dias após a infecção e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo, utilizando o marcador anti-B220. Valores expressos em mediana do percentual populacional. (B) Correlação dos percentuais de células B220⁺ no baço e no sangue dos grupos estudados com a condição clínica dos animais induzida após infecção. Amostras foram analisadas após o sétimo dia de infecção, a partir do qual se iniciam os sintomas de comprometimento do SNC. (C) Ensaio de ELISA para anticorpos IgG anti-NS1 nas amostras de plasma obtidas dos animais infectados, exibindo títulos individuais. d.a.i. = dias após a infecção. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com *p<0,05 e **p<0,01.

4.3.6 Resposta imune adaptativa protetora anti-dengue envolve expressão diferenciada de B220 em células do sangue

Durante os experimentos de imunofenotipagem utilizando o marcador anti-B220, observamos que em algumas amostras de sangue obtidas no período de 7-11 dias após a infecção com DENV2 existia uma pequena população com maior expressão de B220 (B220^{hi}) (Figura 4.28 A). Ao averiguar as características morfológicas desta população com relação aos outros tipos celulares presentes na amostra (*backgating*), foi constatado que grande parte destas células se concentrava em uma posição de maior complexidade interna, compreendendo uma região bem definida sob os parâmetros SSC x FSC (R1), e apenas um pequeno percentual se encontrava na região convencional de linfócitos (R2) (Figura 4.28 B).

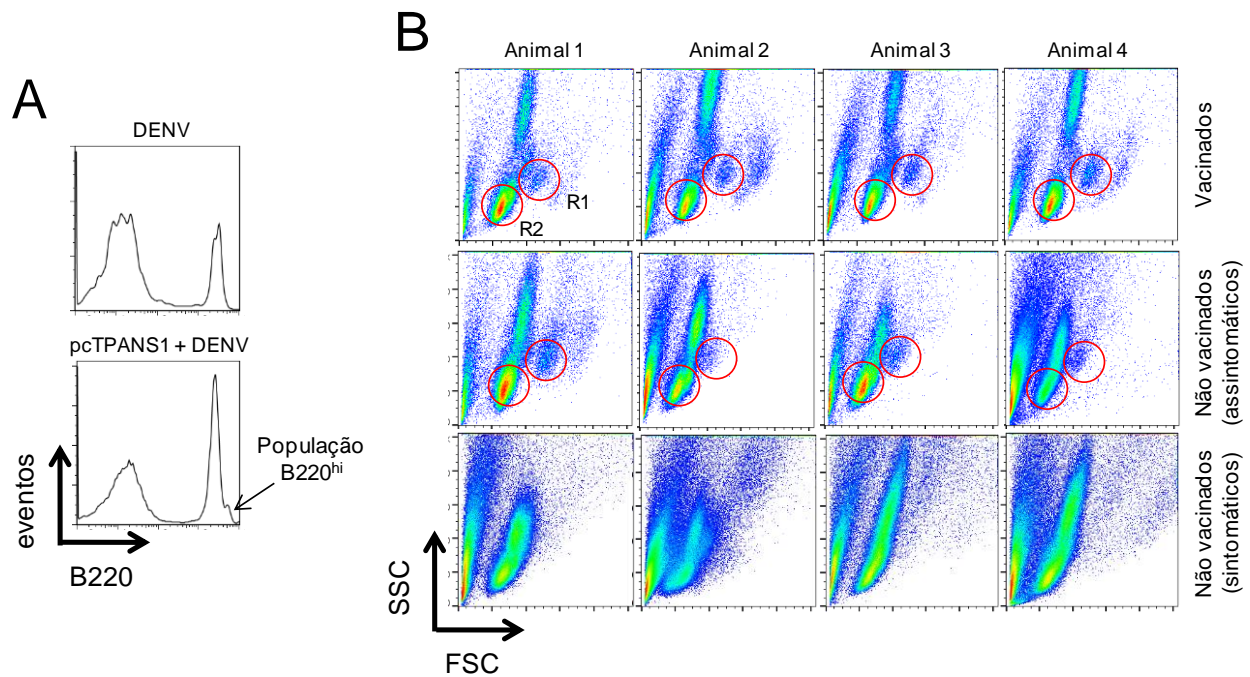


Figura 4.28. Características morfológicas da população B220^{hi} caracterizada no sangue de camundongos BALB/c. Amostras de sangue de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 coletadas a partir do sétimo dia de infecção com DENV2 foram preparadas para análise citométrica utilizando marcador anti-B220. **(A)** Representações em histogramas exibindo uma população B220^{hi} em uma amostra de animal não imunizado ou vacinado com pcTPANS1 e desafiado com DENV2. **(B)** Representação em dispersão de pontos de parâmetros morfológicos (FSC x SSC) exibindo as regiões R1 e R2 onde se concentram os eventos B220^{hi} (*backgating*). As amostras dos quatro animais representados foram processadas e lidas no citômetro de fluxo no mesmo dia de experimento sob as mesmas condições.

Devido à diferenciada complexidade interna (com base no parâmetro SSC) desta população identificada, os percentuais relativos de B220^{hi}_{ag} (população B220^{hi} de alta granulosidade) foram medidos em representação de dispersão de pontos sob os parâmetros SSC e B220 (Figura 4.29 A). Foi observado que os animais que não apresentavam sintomas da infecção possuíam níveis percentuais sanguíneos maiores destas células em relação aos que apresentavam morbidade. O percentual médio de células B220^{hi}_{ag} nos camundongos protegidos pela vacinação com pcTPANS1 ou não vacinados sem os sintomas clínicos (10 %) foi aproximadamente 2 vezes maior em relação ao observado nos animais desprotegidos e sintomáticos (5 %). O grupo controle não estimulado (naïve) apresentou níveis basais entre 1 % e 2 % destas células no sangue (Figura 4.29 B). Este fato nos chamou atenção para um possível correlato de proteção preservado pela imunização com pcTPANS1.

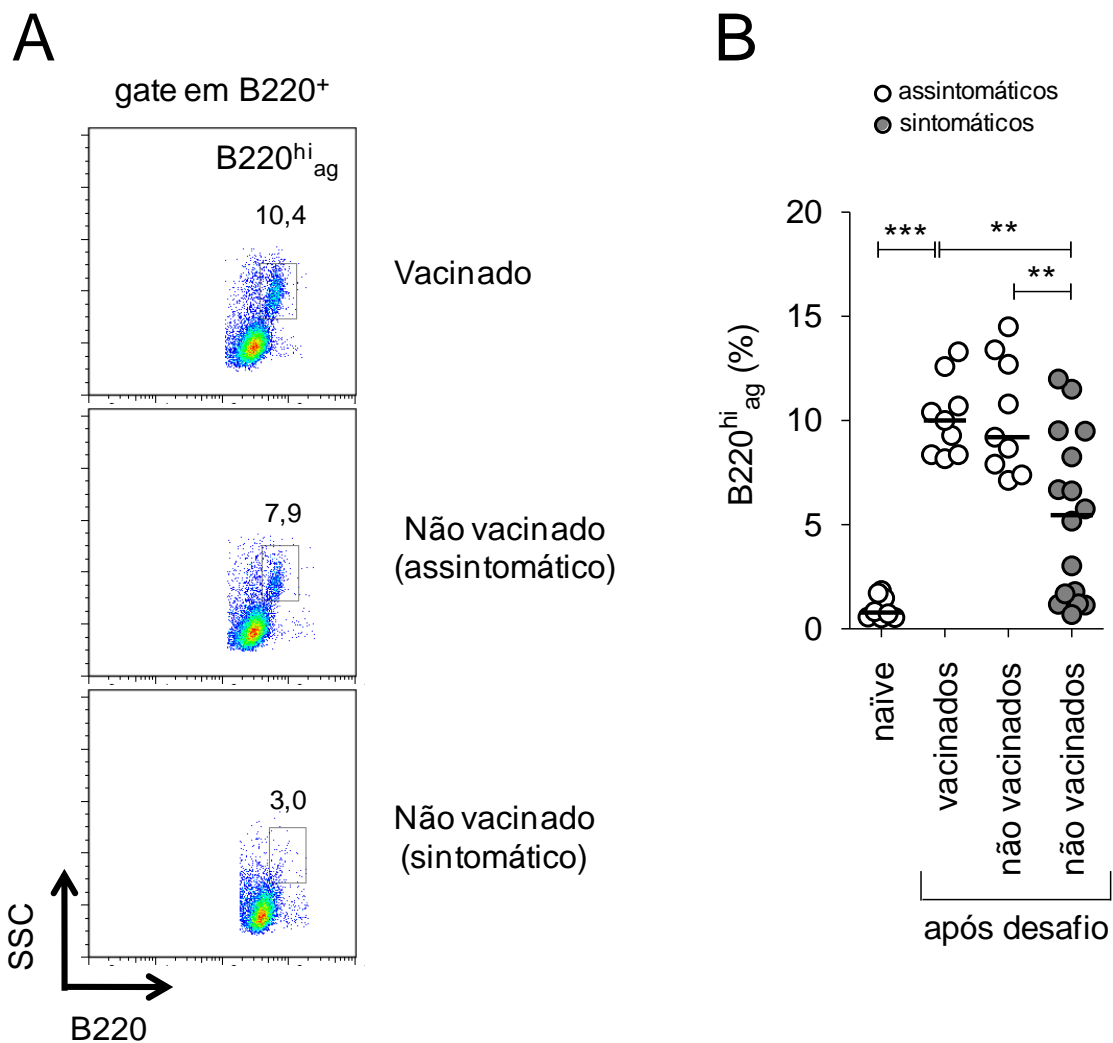


Figura 4.29. Relação entre células B220^{hi} presentes no sangue e a morbidade induzida em camundongos BALB/c após desafio com DENV. Amostras de sangue de camundongos BALB/c vacinados ou não com pcTPANS1 coletadas a partir do sétimo dia de infecção com DENV2 foram preparadas para análise citométrica utilizando marcador anti-B220. **(A)** Representações em dispersão de pontos evidenciando a população B220^{hi} de alta granulosidade (B220^{hi}_{ag}) nos grupos abordados. Valores representam percentual de eventos na região assinalada. **(B)** Percentuais de células B220^{hi}_{ag} com mediana após segregação dos animais sintomáticos e assintomáticos. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas mediante teste não paramétrico de Mann-Whitney com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3.7 Células B220^{hi} permanecem no sangue de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 após a infecção e constituem uma população heterogênea segundo expressão de CD19 e CD49b

Um novo experimento foi executado com a finalidade de investigar a permanência das células B220^{hi} nos animais protegidos pela vacina pcTPANS1, bem como para tentar definir um fenótipo característico destas células. Para isto, camundongos BALB/c (n = 6) foram vacinados com pcTPANS1 segundo o protocolo padrão, desafiados com DENV2 por via i.c. e sacrificados 21 dias após a infecção. Amostras de sangue periférico dos animais foram coletadas e preparadas para análise citométrica, utilizando conjuntamente os marcadores anti-B220, anti-CD19, anti-CD11c e anti-CD49b. Esses marcadores foram selecionados com o intuito de identificar fenótipos relacionados às células B ou células dendríticas. Vale ressaltar que no momento do sacrifício os animais estudados não apresentavam nenhum efeito aparente em decorrência do desafio viral. Com relação à morfologia, todas as amostras dos animais estudados apresentaram aspectos convencionais considerando tamanho e complexidade interna a partir dos quais definimos uma região mãe de análise (R1) (Figura 4.30 A). Em todas as amostras foi observada a presença da população B220^{hi}, entretanto, com uma definição maior do que detectada 7-11 dias após a infecção, sendo esta claramente destacada da população B220⁺ convencional (Figura 4.30 B). Como estas populações celulares se apresentaram em grupos bem definidos com relação a diferenças na complexidade interna, continuamos a investigação delimitando regiões B220^{hi}_{ag}, B220^{hi}_{bg}, B220^{low}_{ag} e B220^{low}_{bg} na representação em dispersão de pontos SSC x B220, sendo “ag” para populações de alta granulosidade e “bg” para populações de baixa granulosidade (Figura 4.30 C).

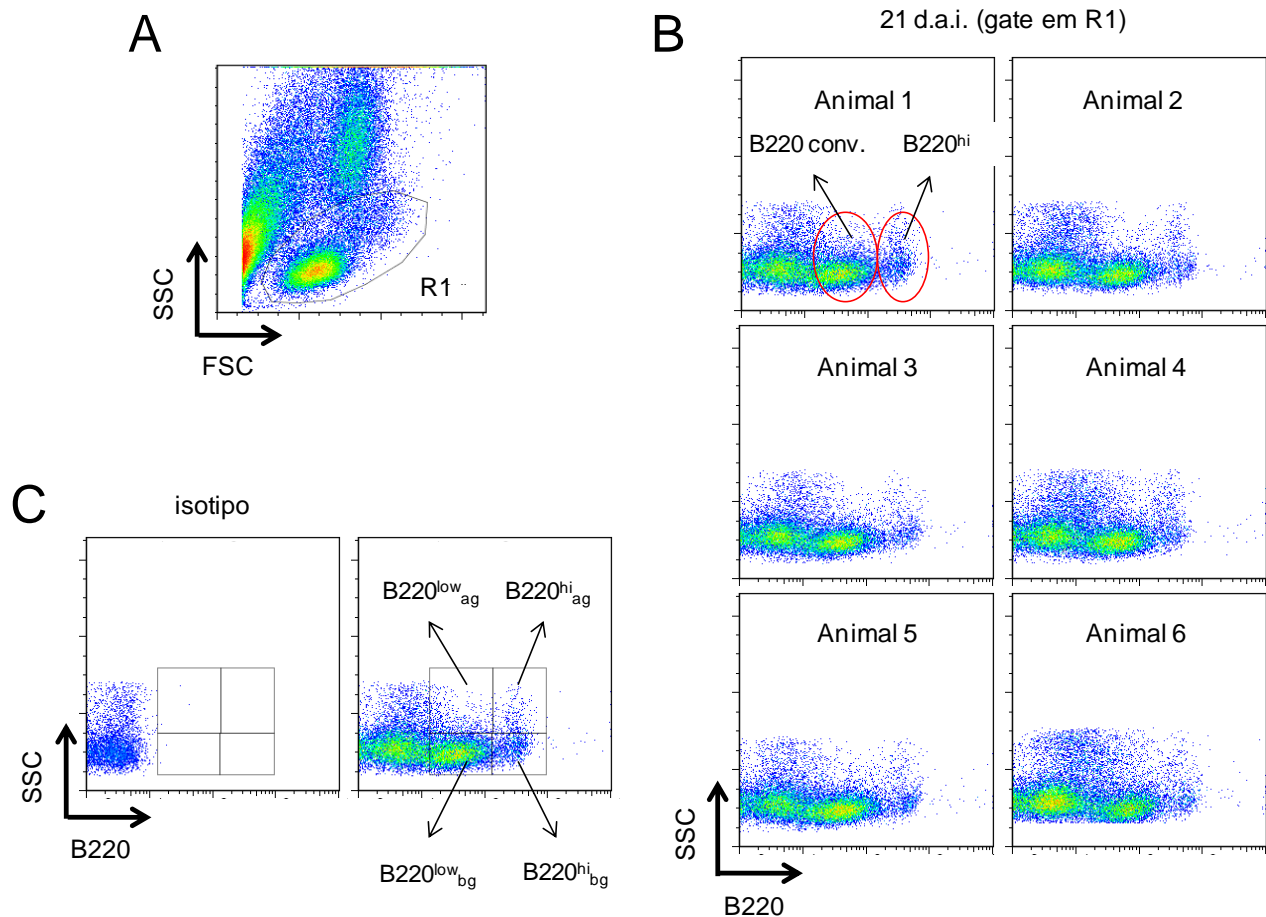


Figura 4.30. Pesquisa de células B220hi em longo prazo após o desafio com DENV em animais vacinados com pcTPANS1. Camundongos BALB/c (n=6) imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 por via i.c., foram testados quanto a presença de células B220^{hi} na circulação 21 dias após a infecção mediante citometria de fluxo. **(A)** Representação em dispersão de pontos SSC x FSC de uma amostra de sangue exibindo a região mãe considerada (R1) na análise. **(B)** Representação de dispersão de pontos SSC x B220 dos eventos contidos em R1, onde se evidencia a presença da população B220hi bem destacada das células B220+ convencionais. Análise individual dos seis animais. **(C)** Populações B220^{hi}_{ag}, B220^{hi}_{bg}, B220^{low}_{ag} e B220^{low}_{bg} consideradas para as comparações fenotípicas. ag = alta granulocidade; bg = baixa granulocidade.

Para cada região considerada ($B220^{hi}_{ag}$, $B220^{hi}_{bg}$, $B220^{low}_{ag}$ e $B220^{low}_{bg}$), foi avaliada a expressão dos marcadores de superfície CD19, CD11c e CD49b, sendo identificado um perfil diferenciado entre elas. Foi observado que CD19 foi altamente expresso em todas as populações consideradas, com exceção das células $B220^{low}_{ag}$, que se mostraram heterogêneas quanto à presença deste marcador na superfície. A expressão de CD11c foi marginal em todas as populações estudadas. Quanto ao marcador CD49b, foi visto uma considerável expressão nas populações de alta granulosidade ($B220^{hi}_{ag}$ e $B220^{low}_{ag}$), enquanto que as células $B220^{hi}_{bg}$ e $B220^{low}_{bg}$ se mostraram, em sua grande maioria, negativas para este marcador de superfície (Figura 4.31).

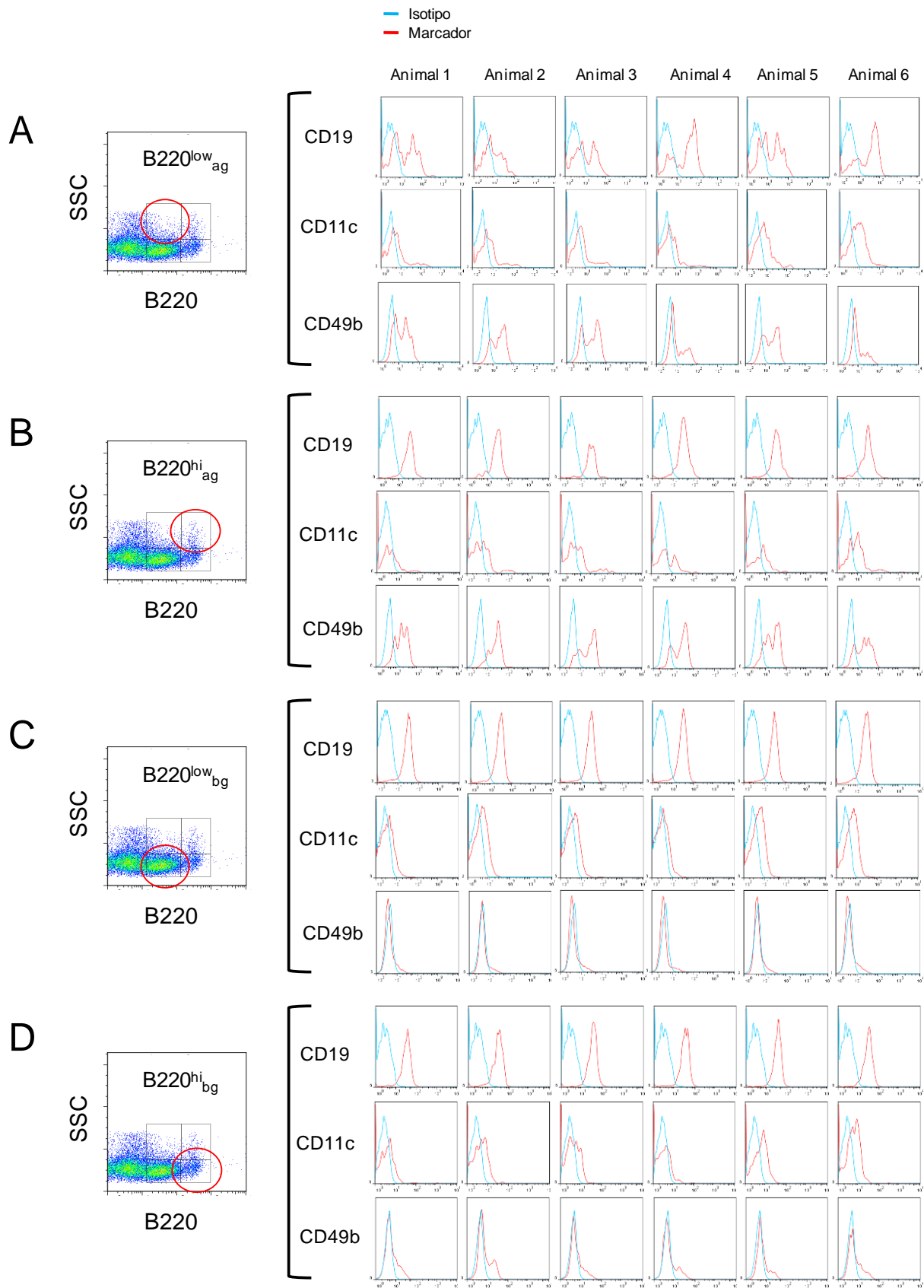


Figura 4.31. Perfis fenotípicos das populações B220⁺ quanto à expressão de CD19, CD11c e CD49b em animais vacinados e analisados 21 dias após infecção com DENV. Amostras de sangue provenientes de camundongos BALB/c (n=6) vacinados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 foram imunofenotipadas utilizando os marcadores anti-B220, anti-CD19, anti-CD11c e anti-CD49b, conjuntamente. As subpopulações foram consideradas para análises como células B220⁺ **(A)** B220^{low}_{ag}, **(B)** B220^{hi}_{ag}, **(C)** B220^{low}_{bg} e **(D)** B220^{hi}_{bg}, cada uma representada no gráfico de dispersão de pontos SSC x B220 circundadas em vermelho com *gate* em R1 (conforme Figura 4.30). Estas células foram analisadas quanto à expressão de CD19, CD11c e CD49b na sua superfície. A análise qualitativa é exibida individualmente. Histogramas azuis – isotipo controle; histogramas vermelhos – marcador analítico.

Tendo em vista estas características fenotípicas, no próximo passo foi avaliada a co-expressão de CD19 e CD49b nas populações B220⁺ consideradas (B220^{hi}_{ag}, B220^{hi}_{bg}, B220^{low}_{ag} e B220^{low}_{bg}). Como esperado, foi observado que as populações B220⁺ de baixa granulosidade (B220^{hi}_{bg} e B220^{low}_{bg}) apresentavam predominância do fenótipo CD19⁺CD49b⁻. O subgrupo de células B220^{low}_{ag} foi o mais heterogêneo com distribuições percentuais aproximadamente equivalentes dos fenótipos CD19⁺CD49b⁻, CD19⁺CD49b⁺ e CD19⁻CD49b⁺. Já a subpopulação de células B220^{hi}_{ag}, foi a que apresentou maior predominância do fenótipo CD19⁺CD49b⁺ (60,5 ± 7,8 %) com relação aos outros grupos analisados (B220^{hi}_{bg}, B220^{low}_{ag} e B220^{low}_{bg}), sendo também observada uma fração de células CD19⁺CD49b⁻ (31,2 ± 8,4 %) (Tabela 4.3).

Dessa forma, vimos que células B220^{hi} são encontradas no sangue de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1, mesmo durante uma fase tardia após a infecção (21 dias após o desafio). Este subgrupo celular possui baixa expressão de CD11c e constitui uma população heterogênea segundo a expressão de CD19 e CD49b, as quais variam conforme suas propriedades morfológicas (maior ou menor granulosidade).

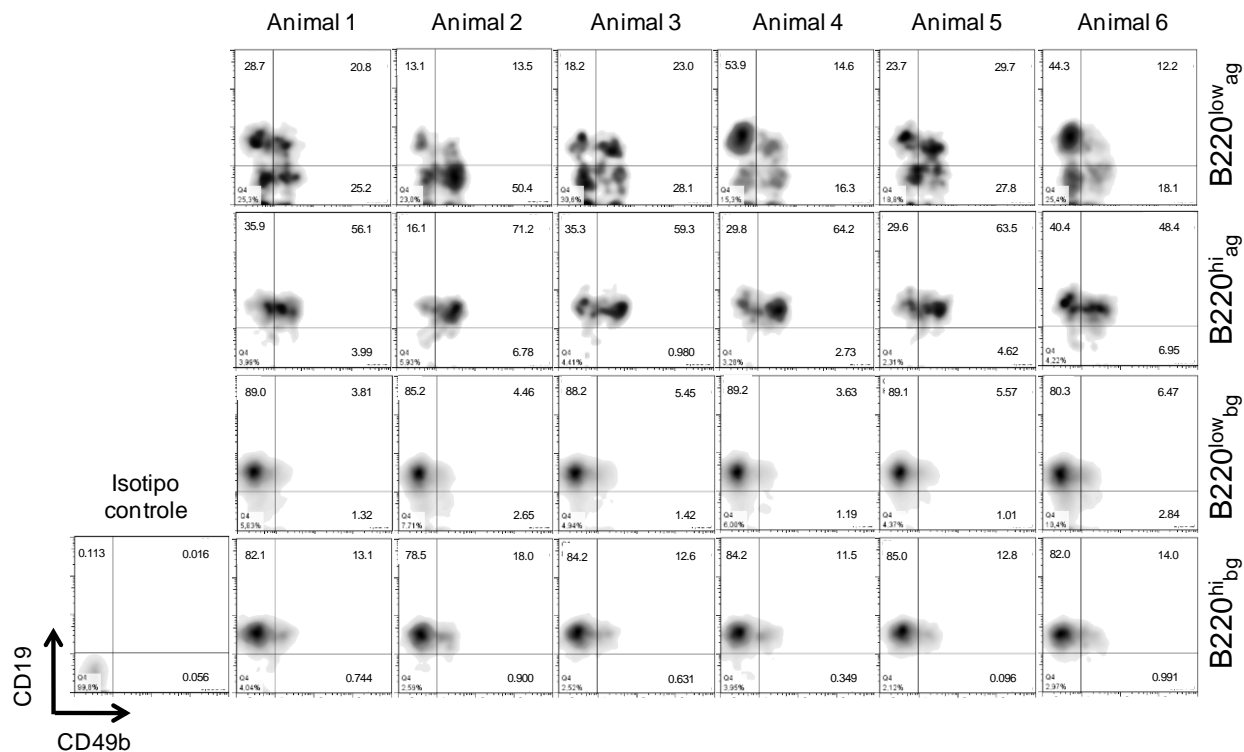


Figura 4.32. Avaliação simultânea de expressão de CD19 e CD49b em subpopulações B220⁺. Os subgrupos de células B220⁺ (B220^{hi}_{ag}, B220^{hi}_{bg}, B220^{low}_{ag} e B220^{low}_{bg}), conforme figura 4.31, foram avaliados quanto à expressão simultânea de CD19 e CD49b. A análise quantitativa foi exibida individualmente (n=6). Representação citométrica em densidade de eventos com valores percentuais representados no interior dos quadrantes.

Tabela 4.3. Expressão de CD19 e CD49b na superfície de subpopulações B220⁺

população celular	CD19+CD49b+	CD19+CD49b-	CD19-CD49b+
B220 ^{hi} _{ag}	60,5 ± 7,8	31,2 ± 8,4	4,3 ± 2,3
B220 ^{hi} _{bg}	13,7 ± 2,3	82,1 ± 2,1	0,6 ± 0,3
B220 ^{low} _{ag}	18,9 ± 6,8	30,3 ± 15,8	27,7 ± 12,2
B220 ^{low} _{bg}	4,9 ± 1,1	86,8 ± 3,5	1,7 ± 0,8

Valores expressos em média do percentual de expressão com desvio padrão (n=6). ag - alta granulidade; bg - baixa granulidade.

4.3.8 Resumo da resposta imune induzida com o pcTPANS1 frente ao desafio com DENV

Em resumo, os principais achados que caracterizaram a resposta imune adaptativa ao antígeno NS1, expresso a partir do pcTPANS1 em camundongos BALB/c, frente ao desafio viral, são exibidos na Tabela 4.4. Para melhor caracterizar os efeitos da proteção conferida pela vacina, os dados foram contrastados entre os grupos: (i) vacinados assintomáticos; (ii) não vacinados assintomáticos; e (iii) não vacinados sintomáticos, em um critério subjetivo de comparação.

Tabela 4.4. Resumo das alterações da resposta imune após vacinação com pcTPANS1 e desafio com DENV2

órgão/sítio	parâmetro	sem sintomas		com sintomas
		vacinados	não vacinados	não vacinados
Baço	TCD4 ⁺	+	+/-	-
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	++	+	-
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁺	+	+/-	-
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁻	+	+	-
	TCD8 ⁺	-	+/-	+
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	++	+	-
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁺	=	=	=
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁻	+	+	-
B220 ⁺	+	+	-	
Sangue	TCD4 ⁺	-	+	-
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	++	+	-
	TCD8 ⁺	++	-	-
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	++	-	-
	B220 ⁺	++	-	-
	B220 ^{hi} _{ag}	+	+	-
	IgG anti-NS1	++	+/-	+/-
	IL-12p70	-	+	++
	TNF-α	+/-	+/-	+
	IFN-γ	-	+	+
	MCP-1	-	-	++
	IL-10	=	=	=
	IL-6	=	=	=
Fígado	TCD4 ⁺	-	+	-
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁺	-	+	+
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁻	++	-	-
	TCD8 ⁺	=	=	=
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁺	-	+/-	+/-
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD69 ⁻	+/-	+	-
Cérebro	infiltrado linfocitário	=	n/a	=
	TCD4 ⁺	+/-	n/a	-
	TCD4 ⁺ CD45RB ^{low}	+/-	n/a	-
	TCD4 ⁺ CD44 ^{hi} CD62L ⁻	=	n/a	=
	TCD8 ⁺	+/-	n/a	-
	TCD8 ⁺ CD45RB ^{low}	+/-	n/a	-
	TCD8 ⁺ CD44 ^{hi} CD62L ⁻	+/-	n/a	-

Legenda: - nível mais inferior; = sem alteração; +/- pouco elevado; + elevado; ++ muito elevado; n/a não avaliado. Os fenótipos celulares são medidos em valores percentuais e as citocinas presentes no sangue foram estimadas em pg/ml.

4. Discussão

A resposta imune primária durante a infecção com DENV2 por via i.c. em BALB/c

A dengue é uma virose transmitida por mosquitos vetores de alta prevalência nos humanos (Guzman et al., 2013). Devido à importância desta doença, a OMS indica que uma vacina anti-dengue constituiria um marco importante na melhoria da saúde pública mundial (WHO, 2009; Beatty et al., 2010; Bhatt et al., 2013). Entretanto, o desenvolvimento de um modelo animal da doença para auxiliar tais pesquisas tem sido um grande desafio, principalmente porque isolados clínicos, em geral, não causam patologia em animais imunocompetentes. Um modelo animal robusto para a infecção por DENV, no qual se reproduzisse as formas graves da doença em um *background* imunocompetente, seria um excelente aliado às observações *in vitro* e aos estudos epidemiológicos, possibilitando assim, o teste de hipóteses baseadas em observações feitas nos humanos. Isto causaria um importante impacto no avanço da elucidação dos mecanismos da patogênese e da imunidade ao DENV. Na busca por um modelo ideal de infecção por DENV, muitos esforços resultaram em diversos modelos animais, que embora com limitações, têm sido úteis para complementar as pesquisas *in vitro* e em humanos.

Modelos de infecção por DENV em primatas não-humanos (NHP) normalmente não reproduzem os sinais clínicos da doença, e geralmente são analisadas somente a viremia e a resposta humoral (Halstead et al., 1973a; Halstead et al., 1973b; Halstead et al., 1973c; Omatsu et al., 2011; Moi et al., 2014). Além disso, o estudo da patogênese da dengue utilizando modelos primatas é pouco explorado na literatura, devido ao número limitado de animais disponíveis, a não reprodutibilidade dos sinais clínicos e também por questões éticas. Portanto, um modelo no qual se utiliza animais de pequeno porte, como os camundongos, é desejável em virtude da maior facilidade de manipulação, manutenção e do maior amparo estatístico das observações experimentais.

No modelo animal abordado no presente estudo, no qual camundongos BALB/c foram inoculados com 40 LD₅₀ de DENV2 NGC pela via i.c., os sinais clínicos principais estão relacionados com o envolvimento do SNC, com manifestações como postura encurvada com comprometimento da coluna cervical e paralisias dos membros locomotores. Relatos na literatura questionam modelos animais de infecção por DENV, onde se observam manifestações clínicas com quadros de paralisia, sob a justificativa da irrelevância sintomatológica quando contrastada com a doença em humanos (Yauch & Shresta, 2008; Plummer & Shresta, 2014). Entretanto, apesar do fato de o envolvimento neurológico na dengue ser considerado incomum por alguns autores (Pattey et al., 1993; Puccioni-Sohler et al., 2009), estudos recentes demonstraram complicações neurológicas na dengue sejam frequentes (Araújo et al., 2012a; Araújo et al., 2012b; Carod-Artal et al., 2013). Além disso, o envolvimento do sistema nervoso central nos casos de dengue é hoje considerado um dos indicativos de dengue grave pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009; Carod-Artal et al., 2013).

Por outro lado, no nosso estudo, após a infecção por via i.c. com o DENV2 NGC, observamos que uma fração relevante dos animais (35,3 %) sucumbiu à infecção sem qualquer manifestação aparente de comprometimento do SNC, enquanto que 54,7 % dos animais morreram após o surgimento dos sintomas. Vimos também que os eventos de morte sem a detecção prévia de sinais de comprometimento do SNC em média antecederam aos eventos de morte após esta manifestação sintomática. Uma explicação para esta diversidade de acontecimentos é complexa, visto que múltiplos mecanismos podem estar envolvidos nestas manifestações. Camundongos A/J, quando inoculados pela via i.v. com o isolado clínico de DENV2 PL046 não-neuroadaptado em camundongos, também manifestam sinais de paralisia e sucumbem à infecção, sendo que nestes animais o vírus foi detectado no cérebro e na coluna espinhal (Shresta et al., 2004). Em um estudo subsequente, este vírus DENV2 PL046, foi adaptado em camundongos e em células de mosquito de forma simultânea, na tentativa de mimetizar um ciclo natural de infecção gerando a cepa D2S10. Camundongos AG129, deficientes dos receptores para IFN I e II, quando inoculados

pela via i.v. com a cepa resultante deste processo de adaptação (D2S10), sucumbiram à infecção do terceiro ao quinto dia após o desafio, sem apresentar qualquer sinal de comprometimento do SNC. Foi visto também que nestes animais, a morte era mediada por TNF- α . Um dado interessante, é que a inibição do TNF- α nos camundongos AG129 desafiados com o vírus D2S10 preveniu a morte dos animais, entretanto estes animais tratados desenvolveram paralisia 21 dias após a inoculação (Shresta et al., 2006). Em outro estudo, camundongos SCID transplantados com células HepG2, quando inoculados intraperitonealmente com DENV2, também desenvolvem paralisia de membros locomotores (An et al., 1999). Portanto, em conjunto, entendemos que a ocorrência de sinais relativos ao comprometimento do SNC em modelos de infecção com DENV em camundongos parecem ser naturais, devido provavelmente a um neurotropismo intrínseco do DENV. Dessa forma, sugerimos que o modelo de inoculação por via i.c. com DENV2 NGC neuroadaptado em camundongos é útil para o estudo da dengue, podendo reproduzir de modo exacerbado manifestações neurológicas que ocorrem na infecção natural em humanos (Domingues et al., 2008).

Este modelo de infecção por via i.c. com vírus DENV neuroadaptado foi amplamente utilizado para avaliações de protótipos vacinais (Kaufman et al., 1987; Bray et al., 1989; Falgout et al., 1990; van Der Most et al., 2000; Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011), onde a eficácia das preparações testadas é estabelecida apenas pela capacidade de prevenir ou não a morte dos animais desafiados. Entretanto, pouco se sabe sobre a qualidade da resposta imunológica induzida na infecção primária neste modelo de infecção. No presente trabalho, tendo em vista a relevância da participação das células T na proteção e/ou na patogênese da dengue, prosseguimos com um estudo da cinética de ativação de linfócitos T após o desafio com DENV2 em animais BALB/c. Tanto no baço quanto no sangue dos animais infectados, foi encontrado um aumento nos percentuais de células CD3⁺CD8⁺ (a partir do terceiro e do quinto dia, respectivamente) (Figura 4.3). Quanto à investigação segundo a ativação celular, detectamos que os percentuais dos fenótipos CD3⁺CD4⁺CD45RB^{low} e CD3⁺CD8⁺CD45RB^{low} também encontravam-se aumentados

no baço e no sangue dos animais infectados, com início por volta do terceiro e do quinto dia após o inóculo viral (Figura 4.3). Citocinas circulantes como IL-12p70, TNF- α , IFN- γ e IL-10, estavam em níveis aumentados no sétimo dia de infecção (Figura 4.8). Adicionalmente, detectamos que o percentual de células B220⁺IgD⁻ era também maior, em relação ao controle, nos animais infectados e analisados nos pontos entre 8 e 11 dias após a infecção. Ainda, neste período, também foi detectado um pico de anticorpos IgG anti-NS1 circulantes (Figura 4.6 e 4.7). Sendo assim, observamos que, mesmo em um modelo de infecção por via i.c., ocorre uma resposta imune sistêmica.

O papel das células T durante uma infecção viral é bem estudado na literatura (Remakus & Sigal, 2013). Em geral, as células TCD8⁺ controlam a infecção viral mediante mecanismos envolvendo citotoxicidade direta com produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α . De modo similar, as células TCD4⁺ também podem contribuir para o controle da infecção viral mediante uma gama de mecanismos, que inclui o auxílio da resposta de células TCD8⁺ e de células B, e o auxílio na produção de citocinas pró-inflamatórias (Sant & McMichael, 2012). Além disso, já foi visto (*in vitro*) que tanto células TCD4⁺ ou TCD8⁺ provenientes de pacientes infectados com DENV, proliferam, produzem IFN- γ e são capazes de causar a lise de células alvo infectadas (Kurane et al., 1989; Mathew et al., 1996; Gagnon et al., 1999), sugerindo que células T sorotipo-específicas são ativadas e funcionais na infecção primária em humanos (Rivino et al., 2013). Desta forma, consideramos a hipótese de que durante a infecção no modelo por via i.c. a ativação das células TCD4⁺ detectada pode estar relacionada com uma resposta auxiliar sobre as populações TCD8⁺ e B para o controle da infecção. Entretanto, não excluimos a possibilidade de subpopulações de células TCD4⁺ também estarem atuando por outros mecanismos que não somente a função auxiliar como, por exemplo, exercendo ação citotóxica direta ou mesmo atividade regulatória.

Embora ainda não nos seja completamente clara a dinâmica da resposta imunológica desenvolvida nos animais infectados pela via i.c., de alguma forma, neste cenário existe repercussão da infecção viral na periferia. Outra grande evidência disto foi a detecção de células T com o fenótipo de ativação/efetor (CD4⁺CD45RB^{low},

CD8⁺CD45RB^{low} e CD8⁺CD44^{hi}CD62L⁻) no tecido hepático dos animais infectados. Consistente com estas observações, dados histopatológicos de experimentos adicionais do nosso grupo, mostraram que os animais no sétimo dia de infecção apresentam lesão tecidual hepática com presença de infiltrado linfocitário. Em um estudo de outro grupo, camundongos C57BL/6 foram infectados pela via i.v. com DENV2 cepa 16681 e células T, especialmente TCD8⁺, se mostraram ativadas (evidenciado pela expressão de CD43, CD69 e pela produção de IFN- γ) e constituíram a principal população encontrada em infiltrados hepáticos nestes animais. Entretanto, neste modelo, os animais infectados não desenvolveram qualquer tipo de sinais clínicos (Chen et al, 2004). Mais recentemente, outro estudo também fez uma associação entre a presença de infiltrados hepáticos em animais infectados por DENV, principalmente formados por células TCD8⁺ e NK, com os efeitos deletérios no órgão (Sung et al., 2012). No caso do modelo aqui abordado, os efeitos periféricos podem ser devido ao fato de que, no momento da inoculação por via i.c., a lesão mecânica pode funcionar como uma “porta de escape” do vírus para a periferia, infectando, por exemplo, monócitos circulantes e também atingindo outros órgãos. Outra possibilidade, é que após o estabelecimento da infecção viral no cérebro, uma lesão tecidual local possa comprometer a barreira hemato-encefálica. Uma evidência que corrobora com a primeira especulação, foi o fato de que foram detectados níveis elevados de citocinas circulantes (IL-12p70, TNF- α e MCP-1) 24 h após a introdução do vírus, o que pode se dever a uma reação da imunidade natural. Outra observação importante foi a detecção de infiltrado linfocitário no cérebro dos animais no período de 8-11 dias após a infecção. Especulamos que tal fato se deve ao comprometimento da barreira hemato-encefálica em virtude do estabelecimento da infecção, uma vez que este infiltrado não foi observado nos animais controles que também foram submetidos ao mesmo procedimento de inoculação (*mock*). Na figura 5.1 está representado um resumo esquemático da hipótese da dinâmica da resposta imune detectada neste modelo experimental a partir dos dados obtidos.

Sabemos que a via de inoculação i.c. empregada no modelo animal abordado é uma limitação quando consideramos que a entrada do agente etiológico no órgão

imunoprivilegiado não mimetiza a via de infecção natural. Por outro lado, embora isto possa envolver uma dinâmica diferenciada da resposta imunológica ao vírus da dengue, a imunocompetência do hospedeiro nos permite considerar a totalidade das variáveis na montagem desta resposta.

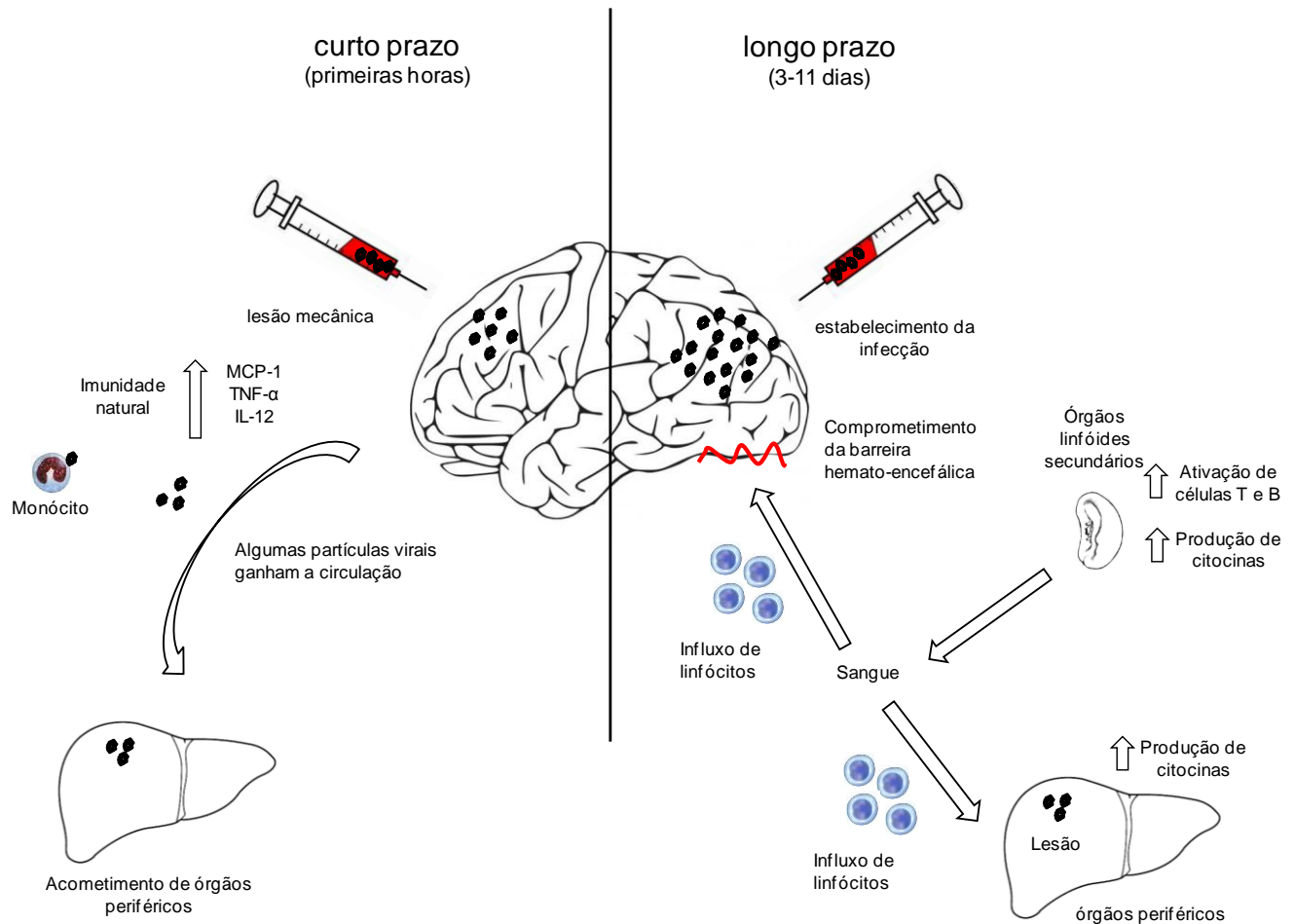


Figura 5.1. Resumo esquemático da hipótese da dinâmica da resposta imune detectada no modelo de infecção por via i.c. A partir dos dados obtidos, esta hipótese sugere que a infecção envolva aspectos em curto prazo, no qual a lesão mecânica em decorrência da inoculação possa funcionar como uma “porta de escape” de partículas virais para a periferia. Dessa forma, o vírus pode infectar monócitos presentes na circulação ou mesmo atingir outros órgãos. Aspectos envolvendo uma fase tardia após o estabelecimento da infecção no cérebro, inclui a ativação de células T e B em órgãos linfóides secundários e o direcionamento de células efetoras para tecidos comprometidos pela infecção. O comprometimento da barreira hemato-encefálica após a instalação do vírus no cérebro poderia permitir o influxo de células T neste órgão.

Resposta imune adaptativa em animais inoculados com vacinas de DNA

Atualmente, muitas vacinas tetravalentes anti-dengue estão em desenvolvimento, sendo a maioria baseada nas proteínas estruturais prM e E do DENV (Guy et al., 2011; Osorio, et al., 2011; Durbin et al., 2011; Coller et al., 2011; Beckett et al., 2011), visando uma resposta de anticorpos neutralizantes. Entretanto, apenas esta resposta humoral pode não ser suficiente para o sucesso de uma vacina contra a dengue. Estudo feito na Tailândia mostrou que crianças que foram imunizadas com uma vacina tetravalente anti-dengue, com a abordagem do vírus quimérico atenuado (febre amarela/dengue), apresentaram níveis equilibrados de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos virais. Entretanto, estas crianças não se mostraram protegidas contra DENV2 (Sabchareon et al., 2012). Este estudo ressaltou a importância da avaliação/consideração do componente da resposta imune celular na proteção contra o DENV.

O potencial antigênico de algumas proteínas do DENV, em particular as proteínas NS1, NS3 e E, foi analisado pelo nosso laboratório, fazendo uso de vacinas de DNA (Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011; Costa et al., 2011). Como estes constructos vacinais possuem sequências que codificam tais proteínas virais fusionadas a um peptídeo sinal que as direciona para a via de secreção, nesta estratégia, tanto uma resposta humoral quanto celular é passível de ser induzida após a imunização. Em estudos anteriores com as vacinas de DNA pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2, que se baseiam nas proteínas NS1, NS3 e E de DENV2, respectivamente, foi demonstrado que estes antígenos podem exercer diferentes graus de proteção em camundongos BALB/c contra o desafio letal com dengue inoculado por via i.c. (Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011; Costa et al., 2011). Em particular, o plasmídeo pcTPANS3 gerou uma proteção parcial contra o desafio, visto que, apesar do alto percentual de sobrevivência dos animais imunizados (90 %), uma fração importante dos que sobreviveram (40 %) apresentaram altos graus de morbidade em decorrência da infecção (Costa et al., 2011). Por outro lado, sob as mesmas condições, as vacinas pE1D2 e pcTPANS1 foram capazes de conferir altos índices de proteção

(aproximadamente 100 %), sendo que apenas de 6,7 % a 10 % dos animais imunizados e desafiados apresentaram sinais clínicos, em geral brandos, após o inóculo viral (Costa et al., 2006; Azevedo et al., 2011). Em virtude desta discrepância protetora entre os diferentes antígenos utilizados, no presente trabalho investigamos a contribuição de cada um deles na resposta imune celular, antes do desafio com DENV2. Observamos que camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS3 e pE1D2 apresentaram aumento na fração de células T com fenótipo de ativação, presentes no baço e no sangue no primeiro caso, e somente no baço no segundo caso (Figura 4.12 e 4.13). Por outro lado, nos animais imunizados com pcTPANS1 sem o desafio com DENV2 detectamos apenas uma participação aparentemente marginal de células T (Figura 4.11). Quanto às células B220⁺, observamos alterações nos percentuais desta subpopulação em todos os grupos de animais vacinados, apesar do seu papel ainda não estar elucidado, sendo necessários estudos futuros utilizando também outros marcadores.

Em um estudo com células humanas, onde se fez um mapeamento da reposta de células T frente aos antígenos do DENV, foi visto que tanto epítomos presentes na proteína E quanto na proteína NS3 produzem uma resposta celular de maior magnitude em relação aos outros antígenos do DENV, com base na produção de IFN- γ e TNF- α . Em particular a resposta celular ao antígeno NS3 parece ser imunodominante e também estar relacionada com a gravidade da doença (Duangchinda et al., 2010). Além disso, a proteína NS3 é o elemento viral do DENV que contém a maior quantidade descrita de epítomos reconhecidos por células TCD4⁺ e TCD8⁺ humanas (Rothman, 2011; Rivino et al., 2013). No caso da abordagem com as vacinas de DNA no presente estudo, esta acabou servindo como uma excelente ferramenta para inferir respostas favoráveis e desfavoráveis ao hospedeiro frente à infecção por DENV. Como nos humanos, a reposta celular anti-NS3 nos camundongos parece ser deletéria, enquanto que a reatividade aos antígenos E e NS1 produzem efeitos mais benéficos ao hospedeiro. De fato, em um estudo realizado pelo nosso grupo, foi observado que a imunização com vacina pcTPANS3 por si só, sem o desafio com dengue, gera danos teciduais nos animais (Yorio, 2012). Ensaio

adicionais, como a caracterização da produção de citocinas por estas células T após a vacinação, poderão contribuir para caracterizar a funcionalidade das subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺ e, conseqüentemente, auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune celular direcionada para cada um dos antígenos estudados.

Particularmente, a proteína NS1 de DENV é altamente intrigante, pois ela está presente em quantidades consideráveis na circulação sanguínea de pacientes com dengue (Young et al., 2000; Alcon et al., 2002). Embora a sua função ainda não esteja bem estabelecida na literatura, diversos relatos mostram que uma resposta imune contra o antígeno NS1 do DENV possui aspectos protetores. Tais estudos incluem imunizações com vacinas de subunidades, vacinas de DNA ou passiva com a inoculação de anticorpos anti-NS1 (Schlesinger et al., 1987; Henchal et al., 1998; Wu et al., 2003; Costa et al., 2007; Amorim et al., 2012). Neste contexto, estudos anteriores no nosso laboratório evidenciaram alguns aspectos da resposta imune adaptativa ao antígeno NS1, utilizando o modelo murino de infecção por via i.c. Foi visto que, em camundongos BALB/c que receberam pCTPANS1 e posteriormente o desafio com DENV2, a resposta imune envolveu a participação de células TCD8⁺ citotóxicas. Além disso, vimos também que esplenócitos extraídos destes animais vacinados responderam ao estímulo com um peptídeo presente na proteína NS1, específico para células TCD8⁺, e produziram IFN- γ (Gonçalves, 2013; Gonçalves et al., 2014, Anexo I). Em decorrência da conhecida importância das células TCD8⁺ no *clearance* viral, estas observações, em um primeiro momento, nos levaram a considerar esta resposta celular como o principal componente na proteção conferida pela vacina. Entretanto, ensaios de transferência e depleção de células TCD4⁺ e/ou TCD8⁺, evidenciaram que, após a vacinação com pCTPANS1, a participação de células TCD4⁺ em conjunto à resposta humoral é crítica na proteção do hospedeiro contra a infecção, enquanto que a contribuição das células TCD8⁺ para este fim parece ser apenas marginal (Gonçalves, 2013; Gonçalves et al., 2014 Anexo I). Consistente com este achado, um estudo recente também sugeriu que uma resposta

imune eficaz induzida por uma vacina anti-dengue deve envolver a participação conjunta da imunidade celular e humoral (Zellweger et al., 2013).

No nosso estudo, identificamos que a partir do quinto dia após o desafio com DENV, os animais protegidos pela vacinação com pcTPANS1 apresentaram ativação marcante de células TCD4⁺ e TCD8⁺, tanto no baço quanto no sangue, considerando a expressão de CD45RB na superfície destas células. No baço destes animais também foi identificado um aumento de subpopulações celulares com os fenótipos TCD4⁺CD44^{hi} e TCD8⁺CD44^{hi}CD69⁻. Além disso, de uma maneira geral, a presença destas populações celulares, TCD4⁺CD45RB^{low}, TCD8⁺CD45RB^{low}, TCD4⁺CD44^{hi}CD69⁺ e TCD8⁺CD44^{hi}CD69⁻ no baço e TCD4⁺CD45RB^{low}, TCD8⁺CD45RB^{low} no sangue, estava relacionada a uma melhor condição clínica dos animais frente à infecção. Isto foi observado não apenas nos animais vacinados, mas também nos não vacinados que ainda não haviam desenvolvido os sinais clínicos, embora em menor grau. Como o CD69 é um marcador de ativação recente de células T (Maino et al., 1995; Prince HE & Lapé-Nixon, 1997), os dados sugerem que o processo de ativação de células TCD4⁺ no baço dos animais protegidos pela vacinação parece ser mais persistente em relação às células TCD8⁺, frente a infecção com DENV. Por outro lado, um relato na literatura mostrou que células TCD8⁺ e NK positivas para CD69 estão presentes em maior quantidade em amostras de sangue de crianças com quadros graves de dengue em relação às amostras de pacientes com dengue branda (Green et al., 1999). No nosso estudo, apesar não termos analisado este marcador nas amostras de sangue, detectamos um aumento no percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ com o fenótipo CD44^{hi}CD69⁺ em linfócitos isolados do fígado de animais controles (não vacinados ou que receberam o plasmídeo controle) que ainda não haviam desenvolvido os sinais graves da infecção (Figura 4.20). Considerando que a maior expressão de CD44 é descrita como relacionada ao *homing* para diversos órgãos (Yasuda et al., 2002), um aumento no percentual desta subpopulação (CD44^{hi}CD69⁺) no fígado dos animais infectados pode estar relacionado com a atuação destas células em órgãos alvos, contribuindo assim para a lesão tecidual e a patogênese da dengue. Entretanto, observamos que o percentual destas

células se mostrou menor nos animais não vacinados que já se encontravam em uma fase terminal da infecção, em relação a este mesmo grupo antes do aparecimento dos sinais clínicos. Tal fato pode ser devido ao quadro grave da doença, envolvendo destruição do tecido hepático, incluindo hemorragia. Por outro lado, no fígado dos camundongos vacinados com pcTPANS1, que não apresentam lesões significativas como os não vacinados (dados do grupo ainda não publicados), os percentuais de células CD44^{hi}CD69⁺ se mostraram basais, semelhantes ao controle não infectado. Sendo assim, formulamos a hipótese de que as células T com o fenótipo CD44^{hi}CD69⁺ estejam de alguma forma intermediando o processo lesivo no fígado dos animais desprotegidos. Especulamos também que as subpopulações de células T com o fenótipo CD4⁺CD44^{hi}CD69⁻ induzidas pela vacina pcTPANS1 estejam relacionadas com efeitos benéficos ao hospedeiro em órgãos alvos, tendo em vista que percentuais maiores destas células foram encontrados no fígado dos animais protegidos pela vacinação.

Outra observação relevante no nosso trabalho foi a detecção de infiltrado linfocitário no tecido cerebral dos animais desafiados com DENV2. Apesar dos camundongos não vacinados também apresentarem um infiltrado de linfócitos, nos animais vacinados com o pcTPANS1 o percentual de células T foi maior. Identificamos que nestes infiltrados a fração de linfócitos TCD8⁺ exibiu fenótipos de células ativadas/efetoras (CD45RB^{low} e CD44^{hi}CD62L⁻), enquanto que para a subpopulação TCD4⁺ o percentual de tais fenótipos de ativação não foi tão evidente. Em um estudo utilizando um modelo similar de inoculação viral por via i.c., camundongos BALB/c que se mostraram protegidos após imunização com a vacina quimérica febre amarela/dengue, contendo as proteínas prM e E do DENV, também apresentaram infiltrado cerebral com predominância de células TCD8⁺. Neste caso, a população celular, inicialmente, exibia um fenótipo de células efetoras (CD43⁺CD44^{hi}CD62L⁻). De forma interessante, estas células TCD8⁺ específicas foram detectadas no tecido cerebral, 20, 40 e até 56 dias após o desafio viral. Ao longo deste período, a redução da expressão de CD43 na superfície destas células sugeriu que provavelmente células TCD8⁺ presentes no SNC sofrem diferenciação para células de memória residente

(van der Most et al., 2003). Nossos dados sugerem que a subpopulação de células TCD8⁺ efetoras detectadas no cérebro dos animais vacinados com o pcTPANS1 deve ter um papel importante na proteção, impedindo provavelmente a progressão da infecção com produção de novas partículas virais.

No ensaio de transferência de células T, utilizando o CFSE como sonda, constatamos que na maioria dos sítios analisados (baço, sangue, cérebro e medula) dos animais recipientes desafiados com DENV, foi possível recuperar um percentual maior de células CFSE⁺ quando estas eram provenientes de animais vacinados com pcTPANS1 em comparação com o grupo que recebeu células retiradas de camundongos não vacinados. Corroborando com os testes de fenotipagem, este ensaio demonstrou a clara participação de células T antígeno-específicas geradas durante a vacinação, com maior velocidade de expansão clonal (células CFSE^{low}), além de seus direcionamentos para diversos locais durante a infecção. Com relação à detecção de células CFSE⁺, o fígado foi um órgão que se mostrou diferenciado dos demais locais de análise. Vimos que em uma resposta imune primária (nos animais que receberam células provenientes de camundongos não vacinados) existe uma tendência de maior acúmulo de células T neste órgão em comparação ao observado na resposta imune adaptativa ao antígeno NS1. Entretanto, apesar da menor quantidade de células recuperadas do fígado dos camundongos que receberam esplenócitos provenientes de animais vacinados, foram encontradas aproximadamente 20 x mais células T que responderam com proliferação em relação aos camundongos controles. Este dado, não apenas reafirma os efeitos periféricos do vírus durante uma infecção primária a partir de uma inoculação por via i.c., mas também mostra que o fígado é um importante órgão alvo durante a infecção. No tecido cerebral, apesar de não detectarmos células T oriundas de processo replicativo, foram detectadas aproximadamente 3 x mais células T provenientes de animais vacinados neste tecido quando comparado à quantidade de células oriundas de animais não vacinados. Em acordo com os achados de fenotipagem do infiltrado cerebral encontrado em animais vacinados e desafiados, aqui vimos que uma pequena quantidade de células TCD8⁺ proveniente de grupos vacinados chega ao tecido

cerebral de animais desafiados, fato que não é observado no controle. Neste caso, sugerimos que esta pequena população celular possa representar células TCD8⁺ com fenótipo efetor para a contenção do estabelecimento da infecção.

Como um reflexo da resposta celular vimos que, de uma forma geral, nos animais somente infectados foi possível detectar níveis mais elevados de citocinas relacionadas a inflamação, em relação aos camundongos vacinados e desafiados. Uma das hipóteses para o agravamento do quadro da dengue em humanos é a ocorrência de uma produção descontrolada de citocinas pro-inflamatórias e vasoativas durante a infecção, o que poderia resultar em alteração de permeabilidade e extravasamento de plasma (Rothman, 2011). Entretanto, no nosso estudo, esta discrepância não foi tão grande, talvez pelo fato de a infecção envolver um menor nível sistêmico devido à via de inoculação. Apesar disto, os menores níveis de citocinas pró-inflamatórias detectados nos animais protegidos da infecção pela vacina pcTPANS1, nos sugere que a resposta imune induzida nestes animais frente ao desafio viral, se dê de forma mais controlada.

Quanto à participação da vertente humoral da resposta imune induzida pela vacinação, no soro dos animais que receberam pcTPANS1 foi evidenciado um *booster* na produção de anticorpos IgG anti-NS1, já no período entre 8 a 11 dias após a infecção. Este achado foi consistente com os dados de fenotipagem do sangue dos animais vacinados, nos quais, neste mesmo período, foram detectadas frações mais elevadas de células B220⁺, quando comparadas as amostras dos animais não imunizados. A importância da vertente humoral da resposta imune induzida pela vacinação com pcTPANS1 foi anteriormente demonstrada no nosso laboratório. Ensaio de transferência passiva revelaram que anticorpos anti-NS1 induzem uma proteção não robusta contra infecção, pois esta é completamente abolida quando se aumenta a dose viral no desafio (de 4 para 40 LD₅₀) (Gonçalves et al., 2014, Anexo I). O caráter de proteção parcial da resposta humoral anti-NS1 também foi anteriormente demonstrado em um modelo semelhante de dengue (Schlesinger et al., 1987), bem como na infecção por outros flavivirus (Schlesinger et al., 1986; Li et al., 212). Entretanto, como explicitado anteriormente nesta discussão, no caso do modelo de

infecção por via i.c, esta resposta humoral associada a uma resposta de células TCD4⁺ induzida na vacinação com pcTPANS1, representa uma combinação fundamental na defesa do hospedeiro contra a letalidade da infecção (Gonçalves et al., 2014, Anexo I).

Na análise das amostras de sangue dos animais vacinados e desafiados com DENV, nos chamou atenção uma população com alta expressão de superfície do marcador B220. Vimos que a presença destas células estava relacionada com uma melhor condição clínica dos animais frente à infecção. Vimos também que esta população celular não foi induzida exclusivamente pela vacinação e pareceu ocorrer naturalmente em resposta a infecção viral. Entretanto, a vacinação com pcTPANS1 pareceu favorecer a presença deste tipo celular especialmente na fase tardia da infecção (8-11 dias após o inóculo). Outros ensaios revelaram que esta população de células B220^{hi} observada nos animais vacinados e desafiados, se mantém até pelo menos 21 dias após o desafio e que ela expressa em sua superfície CD19 e baixas quantidades de CD11c. Entretanto, este grupo celular constitui uma população heterogênea no que diz respeito à expressão de CD49b. Como até onde sabemos, a expressão de CD19 não é observada em células NK e apesar de CD49b e B220 serem observados neste tipo celular em camundongos (Zitvogel & Housseau, 2012), a princípio descartamos a possibilidade deste achado ser representado por estas células. Nossa suspeita, também com base nos aspectos morfológicos observados, é de que esta população possa representar células B em estágios de diferenciação ou mesmo células dendríticas plasmocitóides, tendo em vista a sua importância e participação nas infecções virais (Kamogawa-Schifter et al., 2005). Novos estudos serão necessários para esclarecer que células são estas e qual o seu papel na proteção contra a infecção com DENV.

Em suma, o estudo da resposta imune adaptativa ao DENV utilizando a vacina pcTPANS1 nos forneceu novas idéias a respeito dos mecanismos de proteção induzidos pelo antígeno NS1 (Figura 5.2). Entretanto, em virtude de se tratar de um antígeno não estrutural, a resposta imunológica contra este elemento viral envolve a necessidade de uma replicação inicial do vírus no hospedeiro. Algumas abordagens

vacinais consideram a idéia de que o direcionamento de uma resposta imune contra antígenos estruturais e não estruturais, simultaneamente, poderia resultar em uma defesa mais eficaz contra a infecção (Zheng et al., 2011; Lu et al., 2013). Não somente a entrada do vírus nas células poderia ser impedida por anticorpos neutralizantes, mas também, uma resposta anti-NS1 poderia de alguma forma assegurar o *clearance* viral. Esta dentre outras abordagens vacinais se encontram atualmente em debate para o desenvolvimento de uma vacina eficaz anti-dengue.

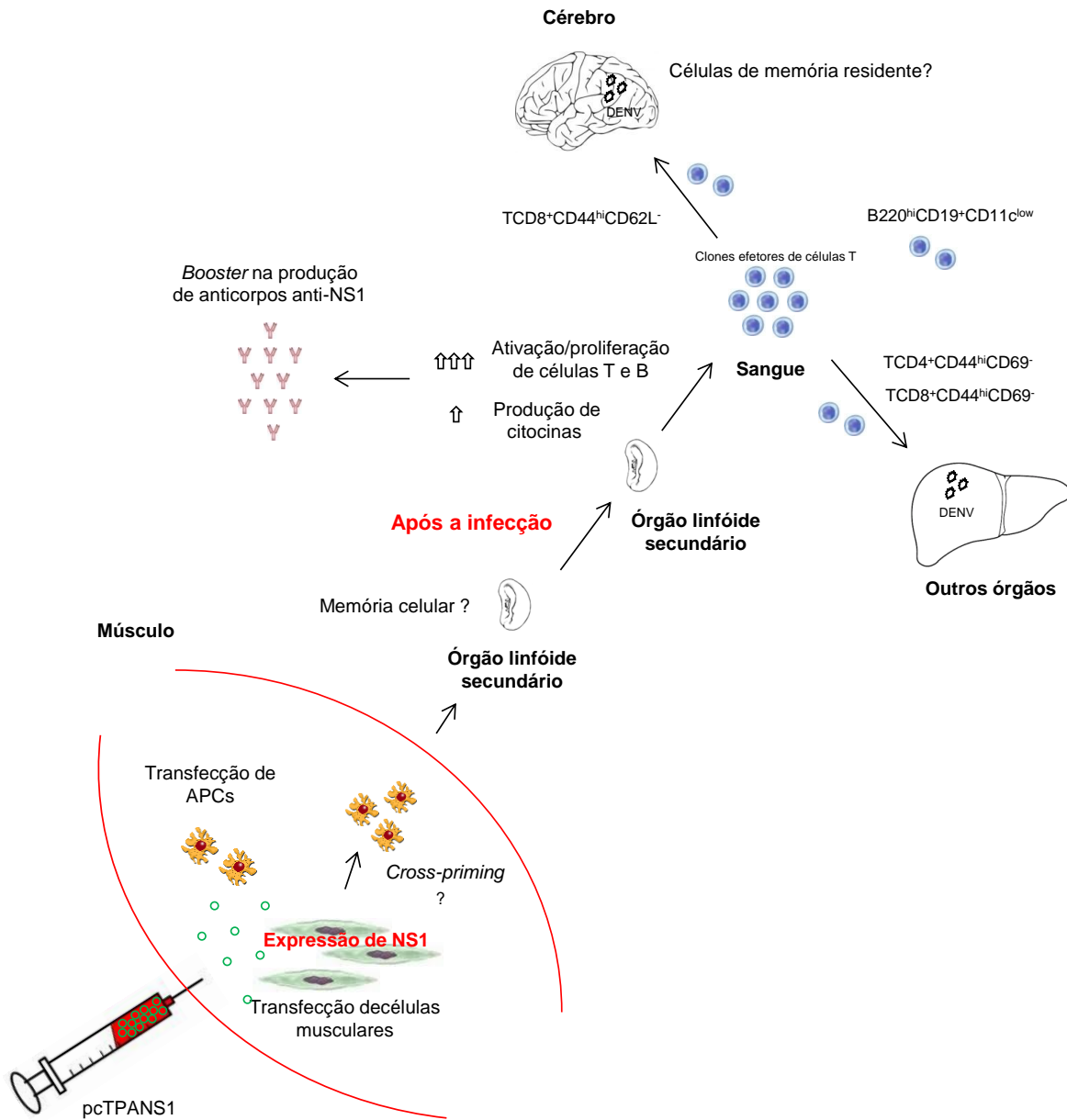


Figura 5.2. Resumo esquemático da hipótese de proteção mediante a imunização com a vacina de DNA pcTPANS1 frente à infecção por DENV. A partir dos dados obtidos, esta hipótese sugere que a vacinação gera inicialmente a formação de células efectoras/memória anti-NS1 específicas. Durante a infecção com DENV, a resposta imunológica induzida nestes animais imunizados seria de forma equilibrada, em relação à produção de citocinas pró-inflamatórias, envolvendo ativação de células T e B, sendo também observado um *boost* na resposta de anticorpos anti-NS1. Clones efetores específicos de células T, com fenótipos característicos ($CD44^{hi}CD62L^-$, $CD44^{hi}CD69^-$), migrariam para órgãos alvo da infecção onde atuariam no *clearance* viral. Além disso, células com o fenótipo $B220^{hi}CD19^+CD11c^{low}$, presentes na circulação destes animais, poderiam estar relacionados à proteção.

5. Conclusões

- O modelo de infecção por via i.c. em camundongos BALB/c exibiu um padrão heterogêneo de letalidade, sendo algumas mortes precedentes de sinais clínicos e outros não;
- Foram observados efeitos sistêmicos decorrentes da infecção com DENV2, como ativação e migração de células T para órgãos periféricos e produção de anticorpos e citocinas, sugerindo a presença do antígeno viral nestes locais;
- Os antígenos E e NS3 (principalmente NS3) de DENV2, induziram ativação de células T mais acentuada do que o antígeno NS1;
- Após o desafio com DENV, animais protegidos pela vacinação com pcTPANS1 apresentaram ativação evidente de células T com proliferação e migração destas células para diversos locais no hospedeiro;
- Os fenótipos $TCD4^+CD44^{hi}$ e $TCD8^+CD44^{hi}CD69^-$ presentes no baço dos camundongos após o desafio se relacionaram com uma melhor condição clínica destes animais. Por outro lado, células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ com o fenótipo $CD44^{hi}CD69^+$, presentes no fígado de animais com sinais clínicos graves da infecção, pareceram estar envolvidas na patogênese;
- Uma população celular $B220^{hi}$ de alta granulosidade foi encontrada no sangue periférico de animais com uma melhor condição clínica frente à infecção por DENV. A vacinação com pcTPANS1 favoreceu a presença destas células na circulação sanguínea em até 21 dias após a infecção;
- A população $B220^{hi}$ de alta granulosidade é positiva para CD19, expressa baixas quantidades de CD11c e se apresenta heterogênea quanto à expressão de

CD49b. Estes resultados sugerem a participação de células dendríticas plasmocitóides ou de células B em processo de diferenciação após a infecção com DENV.

6. Perspectivas

- Correlacionar os nossos achados com a presença ou não do vírus nos tecidos e/ou na circulação;
- Determinar a produção de citocinas em células T de animais vacinados com os plasmídeos pcTPANS1, pcTPANS3 e pE1D2;
- Aprofundar os estudos envolvendo a população B220^{hi} para a determinação da sua influência durante a infecção.

Referências Bibliográficas

- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 2008 Feb;89(Pt 2):474-84.
- Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, Maringer K, Bernal-Rubio D, Shabman RS, Simon V, Rodriguez-Madoz JR, Mulder LC, Barber GN, Fernandez-Sesma A. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002934.
- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):376-81.
- Alves AM, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC. DNA immunisation against the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine.* 2000; 19(7-8):788-95.
- Amorim JH, Diniz MO, Cariri FA, Rodrigues JF, Bizerra RS, Gonçalves AJ, de Barcelos Alves AM, de Souza Ferreira LC. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine.* 2012 Jan 20;30(5):837-45.
- An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology.* 1999 Oct 10;263(1):70-7.
- Anderson JF, Rahal JJ. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jan;8(1):107-8.
- Angsubhakorn S, Yoksan S, Bhamarapravati N, Moe JB, Marchette NJ, Pradermwong A, Sahaphong S. Dengue-4 vaccine: neurovirulence, viraemia and immune

- responses in rhesus and cynomolgus monkeys. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(5):746-9.
- Araújo F, Nogueira R, Araújo Mde S, Perdigão A, Cavalcanti L, Brilhante R, Rocha M, Vilar DF, Holanda SS, Braga Dde M, Sidrim J. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2012a Apr;18(4):677-9.
- Araújo FM, Araújo MS, Nogueira RM, Brilhante RS, Oliveira DN, Rocha MF, Cordeiro RA, Araújo RM, Sidrim JJ. Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. *Neurology.* 2012 Mar 6;78(10):736-42.
- Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 2009; 83(24):12895-906.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006; 193(8):1078-88.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(2):345-56.
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology.* 2001 Dec;204(4):494-507.

- Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One*. 2011;6(7): e20528.
- Balas C, Kennel A, Deauvieu F, Sodoyer R, Arnaud-Barbe N, Lang J, Guy B. Different innate signatures induced in human monocyte-derived dendritic cells by wild-type dengue 3 virus, attenuated but reactogenic dengue 3 vaccine virus, or attenuated nonreactogenic dengue 1-4 vaccine virus strains. *J Infect Dis*. 2011 Jan 1;203(1):103-8.
- Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, Beatty PR, Harris E. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Mar;80(3):416-24.
- Beatty ME, Stone A, Fitzsimons DW, Hanna J N, Lam SK, Vong S, et al. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4: e890.
- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine* 2011;29:960-8.
- Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol*. 2005 Nov;79(21):13797-9.
- Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, Boer E, Wolfenbarger JB, Bloom ME. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol*. 2005 Oct;79(20):12828-39.
- Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, Cardoso MJ, White NJ, Kwiatkowski D. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1998 Mar;177(3):778-82.

- 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. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496 (7446) : 504-7.
- Blaney JE Jr, Johnson DH, Manipon GG, Firestone CY, Hanson CT, Murphy BR, Whitehead SS. Genetic basis of attenuation of dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells. *Virology*. 2002 Aug 15;300(1):125-39.
- Blaney JE Jr, Matro JM, Murphy BR, Whitehead SS. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *J Virol*. 2005 May;79(9):5516-28.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008; 8:86.
- Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignácio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, Kubelka CF. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Feb;96(2):229-32.
- Bray M1, Zhao BT, Markoff L, Eckels KH, Chanock RM, Lai CJ. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1989 Jun;63(6):2853-6.
- Burke DS, Monath TP (2001) Flaviviruses. *Fields Virology*, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 4th Ed, pp. 1043–1125.
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawan DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U,

- Yoon IK, van der Vliet D, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tornieporth NG, Saville M, Bouckennooghe A; the CYD14 Study Group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014 Jul 10. pii: S0140-6736(14)61060-6.
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013 Sep;12(9):906-19.
- Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect*. 2014 Aug 11. pii: S1286-4579(14)00098-7.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Locally acquired Dengue--Key West, Florida, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010 May 21;59(19):577-81.
- Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*. 2006 Jan;123(1):25-30.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. & Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Ver. Microbiol*. 1990; 44: 649-688.
- Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 951:272-85.
- Chang TH, Chen SR, Yu CY, Lin YS, Chen YS, Kubota T, Matsuoka M, Lin YL. Dengue virus serotype 2 blocks extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B activation to downregulate cytokine production. *PLoS One*. 2012;7(8):e41635.
- Chang, G.J. Molecular biology of dengue viruses. 1997. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Gubler, D.J. Kuno, G., eds. Cambridge: CAB International, pp 175-198.

- Chan-Tack KM, Forrest G. Failure of interferon alpha-2b in a patient with West Nile virus meningoencephalitis and acute flaccid paralysis. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(11-12):944-6.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):365-75.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 47(2):155-66.
- Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jul;28(3):183-8.
- Chen HC1, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, Chen YC, Kao CL, King CC, Wu-Hsieh BA. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.* 2004 Jul;73(3):419-31.
- Chen L, Ewing D, Subramanian H, Block K, Rayner J, Alterson KD, Sedegah M, Hayes C, Porter K, Raviprakash K. 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.* 2007; 81(21):11634-9.
- Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend R.R. et al. (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19111-19116.

- Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006; 80(5):2170-82.
- Cole GA, Wisseman CL Jr. Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice. 1. The relation of virus replication to interferon and antibody formation. *Am J Epidemiol.* 1969; Jun;89(6):669-80.
- Coller BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine* 2011;29:7267-75.
- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS et al. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology.* 2007; 358: 413-23.
- Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine.* 2006a; 24: 195-205.
- Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, Motta MA, Freire MS, Alves AM. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One.* 2011;6(10):e25685.
- Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine.* 1996;14(9):910-5.
- Davis HL, Whalen RG. DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1995; 5:368-87.
- Dertzbaugh MT. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid.* 1998;39:100-13.

- Diallo M, Ba Y, Sall AA, Diop OM, Ndione JA, Mondo M, Girault L, Mathiot C. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg Infect Dis*. 2003 Mar;9(3):362-7.
- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol*. 2000 Jun;74(11):4957-66.
- Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*. 2008 Apr 15;267(1-2):36-40.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Immunization with DNA. *J Immunol Methods*. 1994; 176(2):145-52.
- Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(39):16922-7.
- Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*. 2000; 165(5):2850-8.
- Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, et al. A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naive adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis* 2013;207:957-65.
- Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Schmidt AC, Whitehead SS. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to

- identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine* 2011;29:7242–50.
- Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):429-35.
- Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Hoft DF. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e983.
- Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1990 Sep;64(9):4356-63.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):318-28.
- Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med*. 1997; 3(6):362-71.
- Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999 May;73(5):3623-9.
- Gomes AL, Wee LJ, Khan AM, Gil LH, Marques ET Jr, Calzavara-Silva CE, Tan TW. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One*. 2010; 5 (6):e11267.

- Gonçalves AJS. Mapeamento da resposta imune protetora induzida por uma vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Fiocruz/RJ. Tese de doutorado, 2013.
- Gottschalk PG, Dunn JR. The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem.* 2005 Aug 1;343(1):54-65.
- Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol.* 2014 Mar 20;426(6):1148-60.
- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1429-35.
- Green, S.; Rothman, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 Oct;19(5):429-36.
- Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006;277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3.
- Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, Arroyo J, Georgakopoulos K, Catalan J, Monath TP. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol.* 2000 Jun;74(12):5477-85.
- Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2011 Sep 23;29(42):7229-41.
- Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue. West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 2010;28:632–49.

- Guzman MG, AlvarezM, Halstead SB. Secondary infection as a riskf actor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *ArchVirol* (2013) 158:1445–59.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jan;2(1):33-42.
- Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010 Dec;2(12):2649-62.
- Halstead SB, Casals J, Shotwell H, Palumbo N. Studies on the immunization of monkeys against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med Hyg*. 1973a May;22(3):365-74.
- Halstead SB, Palumbo NE. Studies on the immunization of monkeys against dengue. II. Protection following inoculation of combinations of viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1973b May;22(3):375-81.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *J Infect Dis*. 1973c Jul;128(1):15-22.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. 1973b. *J. Infect. Dis*. 128 (1), 7.
- Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Dec;20(6):407-15.
- Halstead SB. Dengue vaccine development: A 75% solution? 2012. *Lancet* 380(9853): 1535-1536.
- Halstead SB. Dengue. 2007. *Lancet*.; 370(9599):1644-52.
- Halstead SB. Phathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988; 239: 476-478.

- Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol.* 1988 Aug;69 (Pt 8):2101-7.
- Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY, Lai JH. 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.* 2005;174(12):8163-72.
- Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):324-31.
- Hotta H, Murakami I, Miyasaki K, Takeda Y, Shirane H, Hotta S. Inoculation of dengue virus into nude mice. *J Gen Virol.* 1981 Jan;52(Pt 1):71-6.
- Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, Wen K, Wang M, Che X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virol J.* 2011; 8(1):47.
- Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol.* 2000 Sep;81(Pt 9):2177-82.
- Iglesias NG, Gamarnik AV. Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA Biol.* 2011 Mar-Apr;8(2):249-57.
- Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine.* 2014 Mar 10;32(12):1326-37.
- Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J.* 2000;14(11):1603-10.

- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004 Apr 15;189(8):1411-8.
- Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):783-6.
- Julander JG, Perry ST, Shresta S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother.* 2011; 21(3):105-16.
- Kalil AC, Devetten MP, Singh S, Lesiak B, Poage DP, Bargenquast K, Fayad P, Freifeld AG. Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 1;40(5):764-6. Epub 2005 Feb 7.
- Kamogawa-Schifter Y, Ohkawa J, Namiki S, Arai N, Arai K, Liu Y. Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2787-92.
- Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Eckels KH. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 Mar;36(2):427-34.
- Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol.* 2007;7:10.
- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology.* 2001;44(2-3):176-97.
- Kitchener S, Nissen M, Nasveld P, Forrat R, Yoksan S, Lang J, et al. Immuno-genicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. *Vaccine* 2006;24:1238–41.
- Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther.* 2001; 3(1):15-24.

- Kubelka CF, Borges PA, VonSydow FF, Lampe E. Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995 Nov-Dec;90(6):741-2.
- Kurane I, Hebblewaite D, Brandt WE, Ennis FA. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* 1984; 52(1):223-30.
- Kurane I, Meager A, Ennis FA. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med.* 1989 Sep 1;170(3):763-75.
- Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis FA. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl.* 1994;9:59-64.
- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparac-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejourn-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etchegorry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010 Sep 30;15(39):19676.
- Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, Rothman AL, Green S. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis.* 2007; 195(8):1108-16.
- Li Y1, Counor D, Lu P, Duong V, Yu Y, Deubel V. Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model. *Virol J.* 2012 Jul 24;9:135.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus

- nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002; 169(2):657-64. Erratum in: *J Immunol* 2002; 169(4):2215.
- Lin YL, Liao CL, Chen LK, Yeh CT, Liu CI, Ma SH, Huang YY, Huang YL, Kao CL, King CC. Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9729-37.
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) *Flaviviridae: The viruses and their replication.* Fields Virology, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 4th Ed, pp. 991–1041.
- Lindow JC, Durbin AP, Whitehead SS, Pierce KK, Carmolli MP, Kirkpatrick BD. Vaccination of volunteers with low-dose, live-attenuated, dengue viruses leads to serotype-specific immunologic and virologic profiles. *Vaccine* 2013;31:3347–52.
- Littau R, Kurane I, Ennis FA. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 1990 Apr 15;144(8):3183-6.
- Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet.* 2005; 55:25-40.
- Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 2011; 239(1):62-84.
- Liu WT, Lin WT, Tsai CC, Chuang CC, Liao CL, Lin HC, Hung YW, Huang SS, Liang CC, Hsu HL, Wang HJ, Liu YT. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant *Salmonella* vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine.* 2006; 24(31-32):5852-61.
- Livingston PG, Kurane I, Dai LC, Okamoto Y, Lai CJ, Men R, Karaki S, Takiguchi M, Ennis FA. Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. *J Immunol.* 1995 Feb 1;154(3):1287-95.

- Lu H, Xu XF, Gao N, Fan DY, Wang J, An J. Preliminary evaluation of DNA vaccine candidates encoding dengue-2 prM/E and NS1: their immunity and protective efficacy in mice. *Mol Immunol.* 2013 Jun;54(2):109-14.
- Lum, L.C., Lam, S.K., Choy, Y.S., George, R., Harun, F., 1996. Dengue encephalitis: a true entity? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 256–259.
- Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry.* 1995 Jun 1;20(2):127-33.
- Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA Jr, Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis.* 1973 Jul;128(1):23-30.
- Mathew A & Rothman AL. 2008. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 225:300-13.
- Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest.* 1996 Oct 1;98(7):1684-91.
- Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J.* 2007; 274(12):2986-3002.
- Miller N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther.* 2010; 12: 31-8.
- Modhiran N, Kalayanarooj S, Ubol S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Dec 21;4(12):e924.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 2004; 427(6972):313-9.
- Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-

- human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *J Gen Virol.* 2014 Mar;95(Pt 3):591-600.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus 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.
- Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, Lang J. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naive adults. *J Infect Dis* 2010;201:370-7.
- Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:587-619.
- Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.* 2011; 29(2):239-47.
- Nagesh K, Tripathi, Ambuj Shrivastava, Paban K. Dash and Asha M. Jana Detection of Dengue Virus Methods in Molecular Biology. 2011; 665, 51-64.
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Nov;5(11):e1397.
- Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013 Oct 25;342(6157):415.
- Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. *J Gen Virol.* 2011 Oct;92(Pt 10):2272-80.

- Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H.M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A.A., Perng, G.C., 2010. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood* 115 (9), 1823.
- Osorio JE, Brewoo JN, Silengo SJ, Arguello J, Moldovan IR, Tary-Lehmann M, Powell TD, Livengood JA, Kinney RM, Huang CY, Stinchcomb DT. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jun;84(6):978-87.
- Osorio JE, Huang CY, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine* 2011;29:7251-60.
- Patey O, Ollivaud L, Breuil J, Lafaix C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Jun;48(6):793-802.
- Pierson TC, Diamond MS. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med.* 2008; 10:e12.
- Plummer EM, Shresta S. Mouse models for dengue vaccines and antivirals. *J Immunol Methods.* 2014 Aug;410:34-8.
- Porter KR, Ewing D, Chen L, Wu SJ, Hayes CG, Ferrari M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. *Vaccine* 2012;30:336-41.
- Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014 Apr 15;9(4):e83386.
- Prince HE, Lapé-Nixon M. CD69 expression reliably predicts the anti-CD3-induced proliferative response of lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Mar;4(2):217-22.

- Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One*. 2010 Jan 14;5(1):e8709.
- Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJ, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology*. 2009 Oct 27;73(17):1413-7.
- Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40(2):91-101.
- Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2008 Jan;89(Pt 1):1-47.
- Raviprakash K, Apt D, Brinkman A, Skinner C, Yang S, Dawes G, Ewing D, Wu SJ, Bass S, Punnonen J, Porter K. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. *Virology*. 2006 Sep 15;353(1):166-73.
- Reiter P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe? *Euro Surveill*. 2010 Mar 11;15(10):19509.
- Remakus S, Sigal LJ. Memory CD8+ T cell protection. *Adv Exp Med Biol*. 2013;785:77-86.
- Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, Teo GH, Gan VC, Lye DC, Leo YS, Hanson BJ, Smith KG, Bertolotti A, Kemeny DM, MacAry PA. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *J Virol*. 2013 Mar;87(5):2693-706.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(16):2773-86.

- 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. Dengue virus. *Clin Lab Med.* 2010 Mar;30(1):149-60.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999; 257(1):1-6.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004; 113(7):946-51.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 15;11(8):532-43.
- Sabchareon A, et al. (2012) Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: A randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 380(9853):1559-1567.
- Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, et al. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:264-72.
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012;380:1559-67.
- Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945 Jun 22;101(2634):640-2.
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10):e1000632.

- Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity. *J Exp Med*. 2012 Jul 30;209(8):1391-5.
- Scherer, W.F., Russell, P.K., Rosen, L., Casals, J., Dickerman, R.W., 1978. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27 (3), 590.
- Schlesinger JJ, Brandriss M W, Cropp CB, Monath TP (1986) Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J Virol* 60: 1153-1155.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. 1987; 68 (3):853-7.
- Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Jul;100(7):608-14.
- Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. 2004; 78(6):2701-10.
- Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol*. 2006 Oct;80(20):10208-17.
- Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3946-54.
- Shresta S. Role of complement in dengue virus infection: protection or pathogenesis? *MBio*. 2012 Feb 7;3(1).

- Simmons M, Burgess T, Lynch J, Putnak R. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology*. 2010; 396(2):280-8.
- Simmons M, Porter KR, Hayes CG, Vaughn DW, Putnak R. 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*. 2006; 80(19):9577-85.
- Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, Ennis FA, Rothman AL. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol*. 2007 Feb;81(4):1592-600.
- Stahl HC, Butenschoen VM, Tran HT, Gozzer E, Skewes R, Mahendradhata Y, Runge-Ranzinger S, Kroeger A, Farlow A. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC Public Health*. 2013 Nov 6;13:1048.
- Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006; 87(10):2755-66.
- Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, et al. Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naive adults. *Hum Vaccine* 2009;5:33-40.
- Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King AD, et al. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:24–31.
- Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(9):e46292.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992;356:152-154.

- Teixeira MG, Siqueira JB Jr², Ferreira GL³, Bricks L⁴, Joint G⁵. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Dec 19;7(12):e2520.
- Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines*. 2014 Jan;2(1):3-9.
- Ulmer JB, Sadoff JC, Liu MA. DNA vaccines. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8(4):531-6.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006; 87(9):2605-14.
- van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R. Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol*. 2003 Jan;15(1):119-25.
- van Der Most RG¹, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):8094-101.
- van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*. 2008 Dec;4(12):e1000244.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000; 181(1):2-9.
- Vogel FR, Sarver N. Nucleic acid vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(3):406-10.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D., Watowich, S.J., Gubler, D.J., Weaver, S.C., 2000. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol*. 74 (7), 3227.

- Weiskopf D, Sette A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Front Immunol.* 2014 Mar 7;5:93.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 518-28.
- Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):1653-7.
- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol.* 2000; 164(9):4635-40.
- World Health Organization. (2013) Impact of Dengue. Available: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>. Acessado em: 27 de setembro de 2013.
- World Health Organization. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Pre-Vention and Control: New Edition. Geneva: WHO Press (2009).
- World Health Organization. Dengue Vaccine Initiative, Subunit, Inactivated Vaccines & DNA Vaccines. Available at: <http://www.denguevaccines.org/subunit-and-inactivated-vaccines>. Acessado em: 20 de agosto de 2014.
- Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF, Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine.* 2003 Sep 8;21(25-26):3919-29.
- Wu, S.J., Hayes, C.G., Dubois, D.R., Windheuser, M.G., Kang, Y.H., Watts, D.M., Sieckmann, D.G., 1995. Evaluation of the severe combined immunodeficient (SCID) mouse as an animal model for dengue viral infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 468–476.

- Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol.* 2002;17(3):945-50.
- Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res.* 2008 Nov;80(2):87-93.
- Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009; 182(8):4865-73.
- Yorio AP. Avaliação do papel da proteína NS3 do vírus da dengue na proteção ou patogênese em camundongos. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Fiocruz/RJ. Dissertação de mestrado 2012.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. 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.* 2000 Mar;38(3):1053-7.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008 Mar 28;319(5871):1834-7.
- Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik LV. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 2010 Oct 7;6(10):e1001131.
- Zellweger RM, Miller R, Eddy WE, White LJ, Johnston RE, Shresta S. Role of humoral versus cellular responses induced by a protective dengue vaccine candidate. *PLoS Pathog.* 2013 Oct;9(10):e1003723.
- Zellweger RM, Shresta S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Frontiers immunology Front Immunol.* 2014 Apr 10;5:151.

Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 23;110(17):6795-9.

Zheng Q, Fan D, Gao N, Chen H, Wang J, Ming Y, Li J, An J. Evaluation of a DNA vaccine candidate expressing prM-E-NS1 antigens of dengue virus serotype 1 with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in immunogenicity and protection. *Vaccine*. 2011 Jan 17;29(4):763-71.

Zitvogel L, Housseau F. IKDCs or B220+ NK cells are pre-mNK cells. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4345-6.

Cooperation between CD4⁺ T cells and humoral immunity is critical for protection against dengue using a DNA vaccine based on the NS1 antigen

Antônio J. S. Gonçalves¹, Edson R. A. Oliveira¹, Simone M. Costa¹, Marciano V Paes¹, Adriana S. Azevedo¹, Márcio Mantuano-Barradas¹, Cecília J. Almeida², Ada M. B. Alves^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Viral Infections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

*Correspondence: Dr. Ada M. B. Alves, Avenida Brasil 4365, Pav. Leônidas Deane, s.200, Rio de Janeiro, Brazil, CEP:21040-360.
E-mail: ada@ioc.fiocruz.br

Abstract

Dengue virus (DENV) is spread through most of the tropical and subtropical areas of the world and represents a serious public health problem. At present, the control of dengue disease is mainly hampered by the absence of antivirals or a vaccine, which results in an estimated half worldwide population at risk of infection. The immune response against DENV is not yet fully understood and a better knowledge of it is now recognized as one of the main challenge for vaccine development. In previous studies, we reported that a DNA vaccine containing the signal peptide sequence from the human tissue plasminogen activator (t-PA) fused to the DENV2 NS1 gene (pcTPANS1) induced protection against dengue in mice. In the present work, we aimed to clarify the contribution of the cellular and humoral responses elicited by this vaccine candidate for protective immunity. We observed that pcTPANS1 exerts a robust protection against dengue, inducing considerable levels of anti-NS1 antibodies and T cell responses. Passive immunization with anti-NS1 antibodies conferred partial protection in mice infected with low virus load (4 LD₅₀), which was abrogated with the increase of viral dose (40 LD₅₀). The pcTPANS1 also induced CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. Although we detected production of IFN- γ and cytotoxicity activity by CD8⁺ T lymphocytes induced by this vaccine, its role in protection was marginal when compared to CD4⁺ cells. Depletion of CD4⁺ cells in immunized mice completely abolished protection. Furthermore, transfer experiments revealed that animals receiving CD4⁺ T cells combined with anti-NS1 antiserum, both obtained from vaccinated mice, survived virus infection equally as observed in pcTPANS1-immunized groups. Overall, results showed that the protective immune response induced by the expression of NS1 antigen mediated by the pcTPANS1 requires cooperation between CD4⁺ T cells and the humoral immunity.

Author Summary

Dengue is an emerging mosquito-borne disease present in an extensive area of the globe with an estimated exposure of half world population at risk of infection. Unfortunately, no specific treatment or vaccine is available to control this disease, which leads to approximately 20,000 casualties annually. The protective immune response against this pathogen consists of an important goal for the development of anti-dengue strategies. For years, the presence of neutralizing antibodies was believed to represent the major response for protection against dengue. However, a recent clinical trial showed that despite the induction of a balanced antibody response against all serotypes, vaccination revealed only partial efficacy. In the present work, we aimed to clarify the contribution of the cellular and humoral responses elicited by a DNA vaccine candidate encoding the non-structural 1 protein (NS1) from dengue virus. We observed that antibody as well as T cell responses are important for protection against dengue in a cooperative way. Results revealed that an effective defense against virus was not achieved with antibodies or T cells only, but rather with the combination of both responses. Therefore, our study suggests that an ideal vaccine against dengue should induce both arms of the immune system.

Introduction

Dengue represents the most important human mosquito-borne disease worldwide. Each year, an estimated 96 million people are infected [1], in which 20000 perish [2]. The illness is caused by dengue virus (DENV), which consists of four distinct serotypes (DENV1-4), present in tropical and subtropical regions of the globe. Infection may be asymptomatic or can be manifested as a non-differentiate febrile, marked mainly by myalgia, headache and retro orbital pain. The most severe forms of the disease are characterized by plasma leakage, thrombocytopenia and hemorrhage, which can evolve to hypovolemic shock [3-4].

The DENV genome is a single positive RNA strand of approximately 11 kb, which is translated into a single polyprotein. This polyprotein is further cleaved into three structural proteins, capsid (C), premembrane (prM), and envelope (E), and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [5].

The NS1 is a conserved N-linked glycoprotein, which is synthesized as a monomer and dimerizes after post-translational modification in the lumen of the endoplasmic reticulum [5]. This glycoprotein is found in mammalian infected cells associated with plasma membrane and also secreted into the circulation as a soluble multimer, with reports of up to 50 µg/mL in the sera of some dengue patients [6-11]. The NS1 is still an enigmatic protein whose mechanistic function remained somewhat unknown. Intracellular NS1 of many flavivirus co-localizes with dsRNA and other components of the viral replication complex and plays an essential cofactor role in replication [12-16]. The secreted form of NS1, in its turn, seems to be implicated in immune evasion strategies. It may inhibit, for instance, complement activation by binding to the regulatory protein factor H [17]. This protein is highly immunogenic, inducing significant levels of anti-NS1 antibodies in dengue infected patients [18-20]. Some reports have pointed the NS1 as a target antigen for the development of dengue vaccines [21-26], while others suggested its role in the pathogenesis [27-34]. Thus, it still remains an apparent paradox due to its ability to elicit both a protective and a potentially pathogenic immune response.

No antiviral treatment against dengue is currently available and the development of an effective anti-dengue vaccine would represent a cornerstone in public health. An important aspect of dengue is that the establishment of an effective immunity can be potentially impaired during heterologous upcoming infections, which may lead to severe manifestations of dengue and represents a great burden in the development of a vaccine against this pathogen [35-40]. There is a consensus that a vaccine against dengue should be tetravalent, inducing a long term protective immunity. Therefore, a better understanding of the immunological mechanisms by which a protective immunity is generated against dengue is becoming increasingly critical for the development of a vaccine. For years, the presence of serum neutralizing antibodies was believed to represent the major component of an effective protection against the infection. Yet, a recent clinical trial showed that neutralizing antibodies alone may not constitute the only key element to confer protection. In fact, despite the induction of a balanced antibody response against all serotypes in this phase IIb trial, vaccination revealed only a partial efficacy [41].

In this concern, here we analyzed the protective immune response elicited by a DNA vaccine (pcTPANS1) encoding the NS1 which, as a non-structural protein, does not elicit neutralizing antibodies. We have previously reported that this DNA vaccine can be protective against DENV infection in mice [23,24]. Herein, we showed that this protection is robust, in part characterized by anti-NS1 specific antibodies and T cells responses. We found that cooperation between CD4⁺ T cells and the humoral response plays a critical role on the establishment of protection against dengue mediated by the NS1 antigen. These data provide new insights on the immunity exerted by DENV NS1 antigen as well as on a prospect for vaccine development.

Materials and methods

DNA vaccine

Immunizations were performed using a DNA vaccine, pcTPANS1, previously described [23,24]. Briefly, this plasmid, derived from pcDNA3 (Invitrogen, USA), encodes the full length NS1 gene from DENV2, strain New Guinea C, fused to the human tissue plasminogen activator signal sequence (t-PA). The pcTPA plasmid [22], without the NS1 gene, was used as control. Plasmids were isolated from transformed *Escherichia coli*, DH5- α strain, and purified by Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Germany) following manufacturer's instruction. The purified plasmids were eluted in endotoxin-free sterile water and kept at -20 °C until use.

Ethics Statement

This mouse study was carried out in accordance with ethical principles in animal experimentation stated in the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Oswaldo Cruz Institute's Animal Use Ethical Committee (approval ID: L067/08 and LW14/12).

DNA immunization

Wild-type SPF male Balb/c mice, 4 to 6 week-old, were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations (CEMIB, UNICAMP-SP). Animals were inoculated by the intramuscular (i.m.) route with 50 μ g of plasmids diluted in 50 μ L of phosphate buffer saline (PBS) in each tibialis posterior muscles (100 μ g/mice) using 27-gauge needles. Each animal group received two doses of the recombinant plasmid, pcTPANS1, or control vector, pcTPA, given 2 weeks apart. Cells and/or sera were collected four weeks after the first immunization or 21 days after virus challenge.

Histological analysis

Liver tissue samples from the Balb/c mice immunized with pcTPANS1 or naïve animals were fixed in formalin (10%), blocked in paraffin resin, cut in 4 μ m, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol, as described

elsewhere [42]. Sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination and visualized in a Nikon ECLIPSE E600 microscope.

Virus challenge

Animals were challenged by the intracerebral (i.c.) route with a mouse brain adapted DENV2, strain New Guinea C (GenBank M29095). Mice were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine [43] and inoculated with 30 μ L of DENV2 suspensions, corresponding to 4 or 40 LD₅₀, diluted in E199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). Animals were monitored for 21 days to observe mortality.

Detection of anti-NS1 antibody response

Mouse serum samples were tested (individually or pooled) for the presence of NS1-specific antibodies by ELISA. Briefly, MaxiSorp plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.4 μ g / well of refolded recombinant NS1 protein [44] in PBS, and incubated for 1 h at 37 °C. After this period, wells were overnight-blocked with 2% skim milk in 0.05% Tween-20-PBS (PBST). In the next day, serum samples were serially diluted and added to plates previously washed 5 times with PBST. After 1 h at 37 °C, plates were washed again with PBST and incubated with goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Southern Biotechnology, USA) for 1 h at 37 °C. Plates were washed in PBST and incubated with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) and H₂O₂ for 20 min at room temperature. Reaction was stopped with 9 N H₂SO₄ solution and visualized at A 490 nm. Titers were established as the reciprocal of serum dilution which gave absorbance higher than mean values of respective non-immunized mouse samples.

Serum transfer

Groups of pcTPA- or pcTPANS1-immunized mice were anesthetized with ketamine-xylazine and sacrificed 15 days after the second DNA dose. Animals were bled by cardiac puncture and sera were pooled and kept at -70 °C until use. For passive immunization by antibody transfer, mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 300 μ L of these sera, three hours before virus injection and every three days after challenge. Antibody transfer was also performed simultaneously with adoptive transfer experiments. In this case, animals were i.p. inoculated with one dose of 500 μ L of pcTPANS1-immunized mouse sera before virus challenge. Animals were followed up for 21 days to establish survival rates.

Interferon- γ ELISPOT Assay

Splenocytes from pcTPA- or pcTPANS1-immunized mice (n=5) were isolated 15 days after the last immunization and used in IFN- γ ELISPOT test. Mouse spleens were disrupted using wire mesh screens, erythrocytes were lysed by treatment with lysing buffer (BD Biosciences, USA), prepared according to manufacturer's instructions, and cells were suspended in RPMI-

1640 medium (Sigma) with gentamicin (0.04 mg/ mL, Sigma). The assay was performed with a synthetic peptide ($^{265}\text{AGPWHLGKL}^{273}$) present in the NS1 protein of DENV2, described as specific for CD8⁺ T cells [45]. The IFN- γ ELISPOT mouse set (BD Biosciences) was used in accordance to the manufacturer's instruction. Briefly, 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 5 μg / mL IFN- γ capture monoclonal antibody in PBS, followed by washing and blocking with supplemented RPMI-1640 medium at room temperature. Splenocytes (2 x 10⁵ cells / well) were added to plates concomitant with the NS1 peptide in 200 μL of RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS (peptide final concentration of 10 μg / mL). Non-stimulated and concanavalin A (Con A, 5 μg / mL) stimulated cells were used as negative and positive controls, respectively. Splenocytes were cultured for 20 h at 37 °C in 5% CO₂. Plates were washed, followed by incubation with biotinylated IFN- γ detection antibody (2 μg / mL) in PBS with 10% FBS. Plates were then washed with PBST and incubated with streptavidin horseradish peroxidase diluted 1:100. Spots were revealed with AEC substrate reagent set (BD Bioscience) at room temperature and counted with an Immunospot reader (Cellular Technology Ltd, USA) using the Immunospot Software Version 3. Results were expressed as the average of spot-forming cells (SFC) per 2 x 10⁶ cells, from triplicate wells, after subtraction of background values detected in non-stimulated splenocytes.

***In vivo* cytotoxicity assay**

The *in vivo* cytotoxicity assay was performed with transfer of NS1 peptide presenting cells to vaccinated recipient mice, based on a previously described protocol [46]. For target cells, splenocytes from naïve syngeneic mice, isolated as described above (item 2.7), were incubated with either 0.5 or 5 μM of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CellTrace, Invitrogen), CFSE^{low} and CFSE^{high}, respectively, in PBS at 37 °C for 15 min. Cells were washed with RPMI-1640 supplemented with 1 % FBS, containing 1 % penicillin/streptomycin (10.000 U/mL, Invitrogen). The CFSE^{high} cells were then incubated in the presence of 25 μM of the NS1 peptide described above ($^{265}\text{AGPWHLGKL}^{273}$) at 37 °C for 40 min, whereas CFSE^{low} cells were incubated in medium only. After labeling and peptide pulsing, both cell populations were washed in medium without FBS and combined in a proportion of 1:1. Cells were intravenously (i.v.) transferred to pcTPA- or pcTPANS1-inoculated mice, which received 10⁷ cells of each population (CFSE^{low} and CFSE^{high}) in a single injection (100 μL) by retro-orbital route. Part of these animals was previously challenged with DENV2 three days before cell transfer. Some animals were also depleted from CD4⁺ or CD8⁺ cells before cell transfer. Recipient mice were sacrificed 20 h following cell transfer and splenocytes were isolated for flow cytometric analysis. Percentage of specific lysis was determined as follows: Cell lysis (%) = $(1 - \text{CFSE}^{\text{high}}/\text{CFSE}^{\text{low}}) \times 100$.

Flow cytometry

Splenocytes from Balb/c mice were isolated and erythrocytes were lysed by treatment with FACS lysing solution (BD Biosciences, USA), prepared according to manufacturer's instructions. Cells were washed in PBS and suspended in 1 % (w/v) bovine serum albumin (Sigma) prepared in PBS.

Approximately 10^6 splenocytes were pelleted and stained for 30 min at 4 °C in the dark with 20 μ L of fluorescent monoclonal antibodies (against: CD3-PE, CD4-FITC, CD8-PerCP and B220-APC, BD Biosciences), previously titrated and mixed. Splenocytes were washed twice, suspended in 300 μ L of PBS and read in a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD, USA). Cell populations were analyzed offline using FlowJo software (Tree Star, USA). For the *in vivo* cytotoxicity analysis, CFSE stained cells were readily analyzed without additional markers.

Depletion of CD4⁺ and CD8⁺ cells

Mice were depleted from CD4⁺ or CD8⁺ T cells by inoculations of in-house produced ascitic fluids before or after virus challenge. Briefly, the in-house ascitic fluids were produced after i.p. inoculation of GK1.5 or 53-6.7 hybridomas (10^7 cells / animal) in nude Balb/c mice in order to obtain anti-CD4 or anti-CD8 antibodies, respectively. Ascitic fluids were collected approximately 15 days after hybridoma inoculations, centrifuged at 500g for 15 min at 4°C, and supernatants were aliquoted and stored at -70°C. For depletions, vaccinated Balb/c mice were i.p. inoculated with 25 μ L of ascitic fluids in days -1, -3 and -5 prior to virus challenge. An additional dose of such ascitic fluids was also administered 15 days after the challenge to ensure cell removal. Non-immunized animals were also depleted from CD4⁺ or CD8⁺ cells before virus challenge. Other controls included vaccinated and naïve animals challenged without depletion. Depletions were previously standardized and checked by flow cytometry.

T cell enrichments and adoptive transfer

Spleens were collected from donors (pcTPANS1- or pcTPA-inoculated mice), disrupted using wire mesh screens, and splenocytes were isolated in RPMI-1640, containing 1 % penicillin/streptomycin (10.000 U/mL, Invitrogen), supplemented with 5 % FBS. Cells were incubated in culture medium only for 1 h and for another 1 h in nylon wool column (previously packed and stabilized with RPMI in 5 % CO₂ atmosphere), both at 37 °C. After elution from nylon wool column with RPMI medium, in order to remove B lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ cells were further purified by negative selection, using a BioMag and cell sorting kit according to manufacturer's instructions (Bangs Laboratories Inc, USA). Briefly, T cell enriched suspension was incubated with ascitic fluids containing anti-CD4 or anti-CD8 antibodies for 30 min at 4 °C, followed by incubation for 20 min with anti-rat IgG magnetic beads at room temperature. Suspensions were then submitted to a magnetic column for negative selection of CD4⁺ or CD8⁺ cells. Finally, cells were collected in culture medium and counted in Neubauer chamber with trypan blue (Invitrogen) staining to assess cell viability.

For T cell transfer to naïve mice, CD4⁺ or CD8⁺ enriched cell suspensions (10^6 and 5×10^5 cells, respectively) were i.v. injected by retro-orbital route in a final volume of 100 μ L. Injections were performed approximately 18 h after virus challenge.

Statistics

Data were analyzed with GraphPad prism software v5.1 (La Jolla, USA) using non-parametric tests. Statistical significance was determined using Mann-Whitney test for ELISA, ELISPOT and flow cytometric comparisons. Survival distributions were evaluated using Log-Rank statistical test. Relevant differences were defined with probability values inferior to 0.05 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

Results

Protection elicited by pcTPANS1 vaccination

The previously constructed pcTPANS1 DNA vaccine contains the DENV2 NS1 gene fused to the t-PA signal sequence, for secretion of the recombinant NS1 protein. After immunization with this DNA vaccine, all Balb/c mice were protected against DENV2 when they were given a viral dose of 4 LD₅₀ (Fig. 1A). When the viral dose was 10-fold increased (40 LD₅₀), we could still observe significant survival rates (approximately 80%) in the vaccinated mouse group when compared to pcTPA-inoculated or naïve control groups, hence suggesting a robust and effective protection induced by the vaccine (Fig. 1B).

Previous reports suggested that the NS1 can play a role in inducing hepatic tissue damages. Thus, in order to evaluate whether the NS1 encoded by the pcTPANS1 DNA vaccine generates hepatic injury, we analyzed the liver of immunized animals. Histological analysis in the liver of vaccinated animals revealed a regular structure of the hepatic parenchyma and sinusoidal capillaries, without circulatory alterations or inflammatory infiltrates, similar to what we observed in naïve mice (Fig. 2). Therefore, this DNA vaccine did not seem to induce pathological effects in the liver of immunized animals.

Humoral immune response promoted by the pcTPANS1 vaccine.

Levels of anti-NS1 specific antibodies.

For weeks after the first DNA dose, only animals vaccinated with the pcTPANS1 presented NS1-specific antibodies, detected by ELISA (Fig. 3). Besides, we observed a significant booster of this response 21 days after challenge with DENV2, with NS1-specific antibody titers approximately 9-fold higher than those detected before virus infection. Naïve or pcTPA-inoculated mice that survived virus challenge, which presented high morbidity signs (data not shown), also exhibited anti-NS1 antibodies, although in significantly lower levels than those observed in vaccinated animals (Fig. 3).

Contribution of anti-NS1 humoral response in protection.

The protective role of the anti-NS1 antibody response was checked by passive immunization, in which naïve mice were injected with several doses of serum samples collected from pcTPANS1- or pcTPA-inoculated animals. After challenge with DENV2 4 LD₅₀, 50% of animals receiving anti-NS1 antiserum (raised in pcTPANS1-immunized mice) survived virus infection, while 80% and

90% of control mice died (naïve animals or mice injected with serum generated after inoculation with pcTPA plasmid) (Fig. 4A). The differences between control animals and mice passively immunized with anti-NS1 antiserum were statistically significant. However, protection conferred by the DNA vaccine was significantly higher than that generated by the serum transfer (Fig. 4A). On the other hand, the partial protection observed by serum transfer was completely abolished when challenge was performed with DENV2 40 LD₅₀, with survival rates similar to control groups (less than 15%), whereas 80% of vaccinated mice remained protected (Fig. 4B).

Activation of the cellular immune response by the pcTPANS1 vaccine.

In order to investigate whether a cellular immune response was induced in animals immunized with the pcTPANS1 DNA vaccine, we initially isolated splenocytes from vaccinated or control animals and performed an ELISPOT assay for detection of IFN γ production. Splenocytes were *in vitro* stimulated with a DENV-NS1 peptide (²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³), previously described as specific for CD8⁺ T cells. Vaccinated animals presented significantly higher numbers of IFN γ -producing cells when compared to samples collected from pcTPA-inoculated mice (Fig. 5A). Positive control using ConA as stimulating antigen confirmed the cell viability of all samples (Fig. 5B).

To assess the functional activity of cells responding specifically to this DENV-NS1 peptide, we analyzed the cytolytic activity of such cells using an *in vivo* cytotoxicity assay in pcTPANS1-vaccinated animals, submitted or not to virus challenge (Fig. 6A). To accomplish such analysis, splenocytes isolated from naïve mice were pulsed with the DENV-NS1 peptide and labeled with high concentration of CFSE. Non-pulsed spleen cells, stained with low concentration of CFSE, were used to control non-specific cytolytic activity. Both cells, CFSE^{high} and CFSE^{low}, were mixed (Fig. 6B) and administered in vaccinated or pcTPA-inoculated mice three days after virus challenge. In the next day, animals were sacrificed and splenocytes were analyzed for detection of cell lysis, comparing high and low CFSE fluorescence intensity (Fig. 6C). In vaccinated animals without virus challenge, we observed only discrete cell lysis (Fig. 6D). In contrast, cell lysis increased significantly when pcTPANS1-immunized mice were challenged with DENV2 (5-fold higher when compared to non-infected animals) (Fig. 6D). Moreover, the cell lysis percentage in control animals, inoculated with the pcTPA plasmid, did not change after virus infection, revealing only non-specific activities (Fig. 6D).

In addition, when a similar experiment of cytotoxicity assay was performed with vaccinated mice depleted from CD4⁺ or CD8⁺ T cells, we observed a significant decrease in cell lysis after depletion of CD8⁺ T cells. On the other hand, no significant difference was detected between non-depleted or CD4⁺-depleted vaccinated animals. Thus, results confirm the specificity of the DENV-NS1 peptide to CD8⁺ cells (Fig. 7).

Contribution of T cells in the protection induced by the pcTPANS1 DNA vaccine.

In order to examine the role of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the protection conferred by the pcTPANS1 vaccine, mice were submitted to antibody

treatment for depletion of these cells, before and after virus challenge. Previously, the depletion procedure was standardized by several inoculations of ascitic fluid containing antibodies against CD4 or CD8, which yielded more than 99% reduction of such cells in mouse blood samples (Fig. S1 and Tab. S1). Depletion of CD8⁺ cells reduced survival rates from 100% to 60% of vaccinated animals challenged with DENV2 4 LD₅₀ (Fig. 8). Interestingly, all pcTPANS1-inoculated mice depleted from CD4⁺ cells died after virus infection, similarly to what we observed in control groups, consisting of non-immunized animals depleted or not from these cells (Fig. 8).

We further evaluated the influence of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the protection against DENV2 by adoptive transfer of these cells collected from pcTPANS1-vaccinated animals. For this experiment, the procedure for enrichment of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was previously standardized by negative selection using specific antibodies. In the CD4⁺ enriched population, we detected a reduction of 84.6% of CD8⁺ cells, while the CD8⁺ enriched sample presented 99.6% depletion of CD4⁺ lymphocytes. All populations exhibited depletion of 90.1% of B220⁺ cells (Tab. S2). For the adoptive transfer immunization procedure we also included groups of animals receiving cells with serum collected from vaccinated mice. Surprisingly, we only observed protection after challenge with DENV2 40 LD₅₀ in the mouse group that received CD4⁺ T cells together with sera from vaccinated animals. In fact, 55% of mice in this group survived virus infection, which was not significantly different from the group of vaccinated mice (with 75% of survival rate) (Fig. 9A). All other tested groups, including those receiving CD8⁺ T lymphocytes together with serum or CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells alone, were not significantly protected (Fig. 9A).

The NS1-specific antibody response was analyzed in serum sample of survived animals after the adoptive T cell/serum transfer experiment. As expected, mice receiving T cells and serum did not presented a significant increase in anti-NS1 antibody titers 21 days after virus challenge (Fig. 9B), thus confirming the absence of previous B cells primed by this antigen. On the other hand, all pcTPANS1-vaccinated animals showed a booster of the humoral immune response with a remarkable increase of anti-NS1 antibody levels (Fig. 9B).

Discussion

In this report we investigated the contribution of the humoral and cellular immune responses induced by a DNA vaccine (pcTPANS1) encoding the NS1 protein in Balb/c mice challenged with DENV2. We observed that both responses are important for protection against dengue in a cooperative way. In fact, results revealed that an effective protection against virus challenge was not achieved with antibody or T cells only, but rather with the combination of both responses.

DNA immunization may be an interesting approach for the development of a vaccine against dengue, since it is recognized as a useful tool to induce both arms of the immune system. Different DNA vaccines have been tested against DENV, most of them based on the dengue virus envelope protein [47-49]. However, several reports have shown that the E protein is also involved in the antibody dependent enhancement of dengue infection (ADE), which instead of

protection by neutralization may lead to an increase of virus replication [50-52]. Thus, the use of NS1 as antigen may be an alternative, since this protein is apparently not involved in the ADE. However, other studies suggested an association between the immune response elicited by the NS1 and the pathogenesis of dengue with the generation of auto-antibodies, which was claimed to be an important factor that contributes to damaging effects of DENV [27-34]. Nevertheless, the mechanism that lies behind it is not fully understood. Anti-NS1 antibodies were shown to cross-react with elements such as platelets, fibrinogen and hepatic endothelial cells, also leading to increased serum levels of ALT and AST [27,31,34,53]. However, there is an apparent paradox between the disease recovery and high levels of anti-NS1 antibodies detected in convalescent patients [18-20]. Hence, in the present work, besides mapping the protective immune response elicited by the DNA vaccine pcTPANS1, we also investigated a possible damage induced by this DNA plasmid in the liver of vaccinated mice. Histological analysis revealed no parenchyma or vascular damages in the hepatic tissue of these animals. Furthermore, vaccinated mice presented serum levels of ALT and AST, similar to naïve animals, thus confirming preserved hepatic function (data not shown). Therefore, our results suggested that the *in vivo* expression of the NS1 mediated by the pcTPANS1 vaccine, and consequently the immune response elicited against it, is safe without apparent pathogenic effects, at least in a mouse model.

We have previously shown that mice immunized with the pcTPANS1 induced antibodies which recognized mainly conformational epitopes in the NS1 protein [23]. It is known that secretion of the recombinant protein mediated by DNA vaccines is crucial for induction of an effective humoral immune response [54-56]. In this regard, we have highlighted before that secretion of the recombinant protein due to the t-PA signal sequence, encoded by the pcTPANS1, was more efficient to generate protection against DENV when compared to the NS1 native signal peptide (present on the C-terminal region of E protein) encoded in another DNA vaccine [24]. In the present study, we initially confirmed protection yielded by the pcTPANS1 against DENV2. Besides, we observed that a 10-fold increase of viral LD₅₀ (from 4 to 40) did not cause a significant impact on the survival rates of vaccinated animals challenged with DENV2, hence revealing that the pcTPANS1 elicits a robust protective immunity.

We next focused efforts to investigate the components of the immune response elicited by the pcTPANS1 which are involved in protection. Levels of anti-NS1 antibodies increased considerably after virus challenge, characterizing memory and booster response after the secondary exposure to the antigen. We observed that passive immunization with several doses of anti-NS1 antiserum, raised in pcTPANS1-inoculated mice, yields partial protection against a lethal challenge with DENV2. These data corroborate with the literature regarding dengue [21] and other flaviviruses such as yellow fever [57] and Japanese encephalitis virus [58], in which anti-NS1 polyclonal serum transfer seemed to confer a limited defense against lethal virus dose. In addition, we found that this protection was completely abrogated when mice were challenged with a 10-fold higher viral dose (40 LD₅₀), thus suggesting that anti-NS1 antibodies by themselves were not able to control virus infection.

In sequence, we found that vaccination with the pcTPANS1 induced NS1-specific cellular immune response, measured by ELISPOT using the DENV-

NS1 peptide ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, which was described as reactive for CD8⁺ T cells. We noticed that splenocytes isolated from vaccinated animals produced IFN- γ after *in vitro* stimulation, demonstrating the potential of a CD8⁺ T cell induction after vaccination. Under *in vivo* conditions, we also detected a T cell cytotoxic activity directed to the same peptide. Furthermore, such activity was significantly abolished when mice were depleted from CD8⁺ T cells, thus confirming the activation of this arm of the immune system. Studies with rhesus macaques also pointed that NS1-specific CD8⁺ T cells are activated in dengue infection, with the production of IFN- γ [59]. Besides, part of these cells was positive to CD107a on their surface, which is a marker of degranulation process and indicates a cytotoxic activity. Moreover, previous reports have also demonstrated the participation of CD8⁺ T cell response in protection against dengue, with a correlation between its cytotoxic activity and secretion of IFN- γ , which contributes to viral clearance [60]. Nevertheless, in this study the cell response was not directed to the NS1. Consequently, our initial results suggested that CD8⁺ T cells would have a fundamental role in the protection mediated by the pcTPANS1 DNA vaccine. However, our following experiments revealed that these CD8⁺ T cells had a surprisingly marginal importance in the protection conferred by the pcTPANS1 when compared to the CD4⁺ T cells.

In fact, 60% of animals immunized with the pcTPANS1 and depleted from CD8⁺ cells still survived virus challenge. In contrast, all vaccinated animals depleted from CD4⁺ cells died after virus infection. Yauch *et al.* [61] also showed that CD4⁺ T cells are important for viral clearance. Authors suggested that CD8⁺ T cells play an important protective role in primary dengue infection, while CD4⁺ T cells are essential in the secondary response, which would be fundamental for vaccination [60,61]. One possible reason for such importance in secondary response would be a helper activity of CD4⁺ T cells for activation of B and/or CD8⁺ T lymphocytes. However, we found that transfer of purified CD4⁺ combined with CD8⁺ T cells from vaccinated mice was not protective in animals challenged with DENV2 40 LD₅₀. Thus, results exclude the hypothesis that the helper function of CD4⁺ over CD8⁺ T cells would consist of the major mechanism involved in the protection here conferred by CD4⁺ lymphocytes induced by the pcTPANS1. On the other hand, several animals receiving CD4⁺ T cells combined with anti-NS1 antiserum, both obtained from vaccinated mice, surprisingly survived virus infection. Besides, survival rates in this animal group did not significantly differ from pcTPANS1-immunized mice. Furthermore, most animals that received only one dose of anti-NS1 antiserum did not survive virus challenge. As expected, no significant increase in NS1-specific serum antibody levels was detected in animals that received CD4⁺ cells combined with anti-NS1 antiserum. Hence, these results revealed that the protection observed here by the transfer of pcTPANS1-elicited CD4⁺ T cells is not because of a helper activity of these cells over B lymphocytes, which would be due to a possible contamination of B lymphocytes from vaccinated animals, leading to a booster of the humoral immune response.

It is important to note that in the present study we used the experimental murine model of Balb/c challenged intracerebrally with a mouse brain adapted DENV2 for testing and mapping the protective immune response induced by the pcTPANS1 DNA vaccine. Unfortunately, there is no immunocompetent murine model that can mimic all the disease spectrum of dengue as we observe in humans. Although symptoms manifested in the chosen model are not exactly

the same described in humans, it has been reported that dengue infection can also lead to encephalitis in some fatal cases. Besides, detection of viral antigens or dengue RNA was also observed in the brain of these patients [62-64]. Such evidences indicate the involvement of the central nervous system in the pathogenesis of dengue. Moreover, we chose this challenge model because it is widely used for vaccine testing against dengue virus [65-70]. In addition, we needed an immunocompetent host in order to explore all the components of the immune response which may be involved in the protection induced by the pcTPANS1.

Overall, we understand that the robust protective immunity generated by the pcTPANS1 in mice is strongly afforded by CD4⁺ T cells and the presence of antibodies. Nevertheless, the precise mechanism involved in this protection is yet to be elucidated.

Acknowledgments

We thank Dr. Luis Carlos S. Ferreira (Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, USP, Brazil) for kindly supplying the recombinant NS1 protein used in ELISA assays and Heloisa Diniz (Service of Image Production and Processing, IOC, Fiocruz, Brazil) for the technical assistance with the figures.

References

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW *et al.* (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496-504.
2. Gubler D.J. (2012) The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 86: 743.
3. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.
4. Chuansumrit A, Chaiyaratana W (2014) Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Res* 133: 10-16.
5. Lindebach BD, Rice CM. (2001) Flavirididae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors *Fields Virology*. 4th ed. 991-1041.
6. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA *et al.* (1999) Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion *J Virol* 73: 6104–6110.
7. Jacobs MG, Robinson PL, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR (2000) Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-

phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *Faseb J* 14: 1603-1610.

8. Somnuk P, Hauhart R E, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P (2011) N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion cell-surface expression hexamer stability and interactions with human complement. *Virology* 413: 253–264.
9. Young PR, Hilditch PA , 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* 38: 1053-1057.
10. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C *et al.* (2006) Secretion of flaviviral nonstructural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp* 277: 233–247.
11. 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* 98: 192-208.
12. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220: 232-240.
13. Lindenbach BD, Rice CM (1997) Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* 71: 9608-9617.
14. Lindenbach BD, Rice CM (1999) Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73: 4611-4621.
15. 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* 71: 6650-6661.
16. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. (2000) Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol* 74: 3253-3263.
17. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend R.R. *et al.* (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19111–19116.
18. Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gomez I (1990) Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. *J Med Virol* 32: 102-108.
19. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S (1991) Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 44: 481-493.

20. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L et al. (2000) Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 62: 224-232.
21. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh E (1987) Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68: 853-857.
22. 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.
23. Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM et al. (2006). Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 24: 195-205
24. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS et al. (2007) DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* 358: 413-423.
25. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK et al. (2003) Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine Against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 21: 3919–3929.
26. Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R et al. (2014) Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One* 9: e92495
27. Falconar AK (1997) The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142: 897-916.
28. Falconar AK (2007) Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE type 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* 5: 493-504.
29. 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. *J Biol Chem* 11: 9726-9736.
30. Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH 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: 743-751.
31. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS *et al.* (2003) Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 69: 82–90.
 32. Lin C, Chiu S, Hsiao Y, Wan S, Lei H, *et al.* (2005) Expression of Cytokine chemokine and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein. *J Immunol* 174: 395-403.
 33. Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, *et al.* (2003) Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol* 71: 259-64.
 34. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, *et al.* (2007). Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost* 5: 2291-2299.
 35. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 42: 311–328.
 36. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, *et al.* (2003) Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9: 921-927.
 37. Kinney RM, Huang CYH (2001) Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 44: 176-197.
 38. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Brian RM (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5: 518-528.
 39. Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30: 4301-4306.
 40. Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E (2014) A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flavivirus for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32: 1326-1337.
 41. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P *et al.* (2012) Protective efficacy of the recombinant live-attenuated CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomized controlled phase 2b trial. *Lancet* 380: 1559-1567.
 42. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhao AT *et al.* (2009). Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 89: 1140-1151.

43. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G. (1984). A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone ketamine-xylazine carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med* 184: 159-169.
44. Amorim JH; Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, Costa SM *et al.* (2010) Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods* 167: 186-192.
45. Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X *et al.* (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: 927-936.
46. Martin DL and Tarleton RL (2005) Antigen-Specific T Cells Maintain an Effector Memory Phenotype during Persistent. *J Immunol* 174: 1594-1601.
47. Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I *et al.* (2001) Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* 290: 74-82.
48. Danko JR, Beckett CG, Porter KR (2011) Development of dengue DNA vaccines. *Vaccine* 29: 7261-7266.
49. Azevedo AS, Gonçalves AJ, Archer, Freire MS, Galler R *et al.* (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: e58357
50. Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201-217.
51. Halstead SB. Dengue (2007) *Lancet* 370: 1644-1652.
52. Murphy BR, Whitehead SS (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29: 587-619.
53. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC *et al.* (2008) Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab. Invest* 88: 1079–1089.
54. Boyle JS, Koniaras C, Lew AM (1997) Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9: 1897–1906.

55. Inchauspe G, Vitvitski L, Major M, Jung G, Spengler U *et al.* (1997) Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 16: 185–195.
56. Alves AMB, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC (1999) New vaccine strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. I: DNA vaccines against the CFA/I fimbrial adhesin. *Braz J Med Biol Res* 32: 223-229.
57. Schlesinger JJ, Brandriss M W, Cropp CB, Monath TP (1986) Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J Virol* 60: 1153–1155.
58. Li Y, Lu D.C.P, Duong V, Yu Y, Deubel V (2012) Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model *Virol J* 9: 135.
59. Mladinich KM, Piaskowski SM, Rudersdorf R, Eernisse CM, Weisgrau KL *et al.* (2012) Dengue virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics* 64: 111-121
60. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J *et al.* (2009). A protective role for dengue virus-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol* 182: 4865-4873.
61. Yauch LE, Prestwood TR, May M, Morar MM, Zellweger RM *et al.* (2010) CD4⁺ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8⁺ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 185: 5405-5416.
62. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RMP, Cuzzimaya T *et al.* (1997) Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 16: 204-208.
63. Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D *et al.* (1998) Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* 4: 465-468.
64. 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: 75-79.
65. 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 immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 143: 997-1003.
66. Caufour OS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira *et al.* (2001) Construction characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res* 79: 1-14.

67. 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: 249–258.
68. 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: 2705-2715.
69. Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M *et al.* (2011) DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One* 6: e20528.
70. Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC *et al.* (2011) Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One* 6: e25685.

Figure Legends

Figure 1. Survival rates of vaccinated or non-immunized Balb/c mice after challenge with DENV2. Groups of Balb/c mice (n=10) 4 weeks old were inoculated with two doses of the DNA vaccine pcTPANS1 or the control plasmid pcTPA (100 µg of DNA/dose given two weeks apart). Two weeks after the second dose animals were intracerebrally inoculated with (A) 4 LD₅₀ or (B) 40 LD₅₀ of neuroadapted DENV2 NGC strain. Naïve animals were also challenged with 4 or 40 LD₅₀ DENV2. Animals were observed 21 days after challenge for evaluation of survival rates. Asterisks indicate significant differences between vaccinated and control animals using Log-Rank statistical test. *** p<0.001.

Figure 2. Histological analysis of the liver of pcTPANS1-vaccinated mice. Representative histological analysis of control (naïve) and vaccinated mice stained with H.E. Liver of (A) naïve or (B) vaccinated mice immunized with two doses of the pcTPANS1 presenting hepatic parenchyma and sinusoidal capillary with regular structure. Central Vein (CV); Sinusoids capillaries (SC).

Figure 3. Titration of NS1-specific antibodies. NS1-specific antibodies were quantified in mouse serum samples (n = 5) using recombinant NS1 protein as a solid phase antigen in ELISA plates. Sera were collected before and after DENV2 challenge. Data are represented as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate significant differences between groups using Mann-Whitney statistical test. *** p<0.001.

Figure 4. Survival rates of mice passively immunized with anti-NS1 polyclonal antiserum and challenged with DENV2. Balb/c mice (n=10) were intraperitoneally injected with several doses of anti-NS1 polyclonal antiserum before and after challenge with DENV2. Sera for immunization were obtained from pcTPANS1- or pcTPA-inoculated animals. After challenge with (a) 4 LD₅₀ or (b) 40 LD₅₀ mice were monitored for 21 days for the establishment of survival curves. Controls also included pcTPANS1-immunized (DNA vaccine) or naïve mice challenged with DENV2. Asterisks indicate significant differences between groups using Log-Rank statistical test. *p<0.05; *** p<0.001.

Figure 5. Production of IFN-γ by splenocytes from pcTPANS1-immunized mice. Spleens obtained from Balb/c mice inoculated with pcTPANS1 or pcTPA (n=5) were collected 2 weeks after the second DNA dose and processed for IFN-γ ELISPOT assay. (A) Splenocytes were stimulated with a synthetic peptide ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ previously described as specific for TCD8⁺ cells or (B) with concavalin A as a positive control. Numbers of spot-forming cells were quantified 24 h after stimulation. Values are expressed as mean of IFN-γ spot forming cells (SFC) and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant difference using Mann-Whitney test. *** p<0.001.

Figure 6. *In vivo* cytotoxicity assay. (A) Schematic representation of the assay. Balb/c mice inoculated with pcTPANS1 or pcTPA plasmids challenged or not with DENV2 (40 LD₅₀) received a mixture of splenocytes obtained from naïve mice incubated with CFSE 0.5 μM or 5 μM (CFSE^{low} and CFSE^{high} respectively). CFSE^{high} splenocytes were previously pulsed *in vitro* with the synthetic peptide ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³. Animals (n = 6) were sacrificed 20 h after cell transference and splenocytes were collected and analyzed by flow cytometry. (B) Cytometric dot plot and histogram representing the mixture (1:1) of CFSE^{high} (M1) and CFSE^{low} (M2) splenocytes (inside R1) used for cell transference. (C) Representative dot plots of CFSE^{high} and CFSE^{low} splenocytes (top and bottom regions respectively) observed in recipient mice 20 h after cell transference. Values represent the number of CFSE positive cells normalized to 20000 considered events. (D) Percentages of cell lysis observed in analyzed groups calculated as follows: Cell lysis (%) = (1 - CFSE^{high}/CFSE^{low}) x 100. Data are expressed as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences using Mann-Whitney test. ** p<0.01.

Figure 7. *In vivo* cytotoxicity assay with T cell depleted recipients challenged with DENV2. The *in vivo* cytotoxicity assay was carried out as described in Figure 6 and groups of recipient mice (n = 6) were depleted from TCD8⁺ or TCD4⁺ cells by inoculation of anti-CD4 or anti-CD8 antibodies respectively. Values represent percentages of cell lysis as described in Figure 6 expressed as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences between groups Mann-Whitney test. * p<0.05.

Figure 8. Survival rates of T cell depleted pcTPANS1-immunized mice after challenge with DENV2. Balb/c mice immunized with pcTPANS1 (n=10) were intraperitoneally injected with 3 doses of anti-CD4 or anti-CD8 ascitic fluid before virus challenge (4 LD₅₀) and one dose after infection. Controls included non-immunized mice depleted from CD4⁺ or CD8⁺ cells and vaccinated only or naïve animals all of them challenged with DENV2. Animals were monitored for 21 days after challenge. Asterisks indicate significant differences using Log-Rank statistical test. ***p<0.001.

Figure 9. Protection induced by T cell adoptive transfer and antibody response (A) Survival rates of Balb/c mice after T cell adoptive transfer and challenge with DENV2. CD4⁺ or CD8⁺ T cells purified from splenocytes of pcTPANS1-immunized mice were intravenously transferred to naïve Balb/c recipients. Animals were inoculated only with purified cells or together with pooled sera (intraperitoneally injected) obtained from pcTPANS1-immunized mice. One day after cell transference mice were challenged with DENV2 (40 LD₅₀) and monitored for the next 21 days. Data represent a compilation of two independent experiments with groups of 10 animals in each test (n = 20). Asterisks indicate significant differences using Log-Rank statistical test. ns (non-significant); *p<0.05; ***p<0.001. (B) Individual NS1-specific antibody

response in serum samples collected from survived animals of one representative experiment evaluated by ELISA. Anti-NS1 antibody was also assessed in pooled sera (pcTPANS1^a) used for inoculations.

Figure S1. Depletion of T cells in Balb/c mice. Representative cytometric dot plots showing percentages of TCD4⁺ and TCD8⁺ cells observed in peripheral blood of naïve or T cell-depleted Balb/c mice. Anti-CD8 or anti-CD4 antibodies were intraperitoneally administered for depletion of lymphocyte populations.

Table S1. Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells in depleted Balb/c mice.

Table S2. Percentage of CD4⁺ and TCD8⁺ T cells in enriched populations from Balb/c mice.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

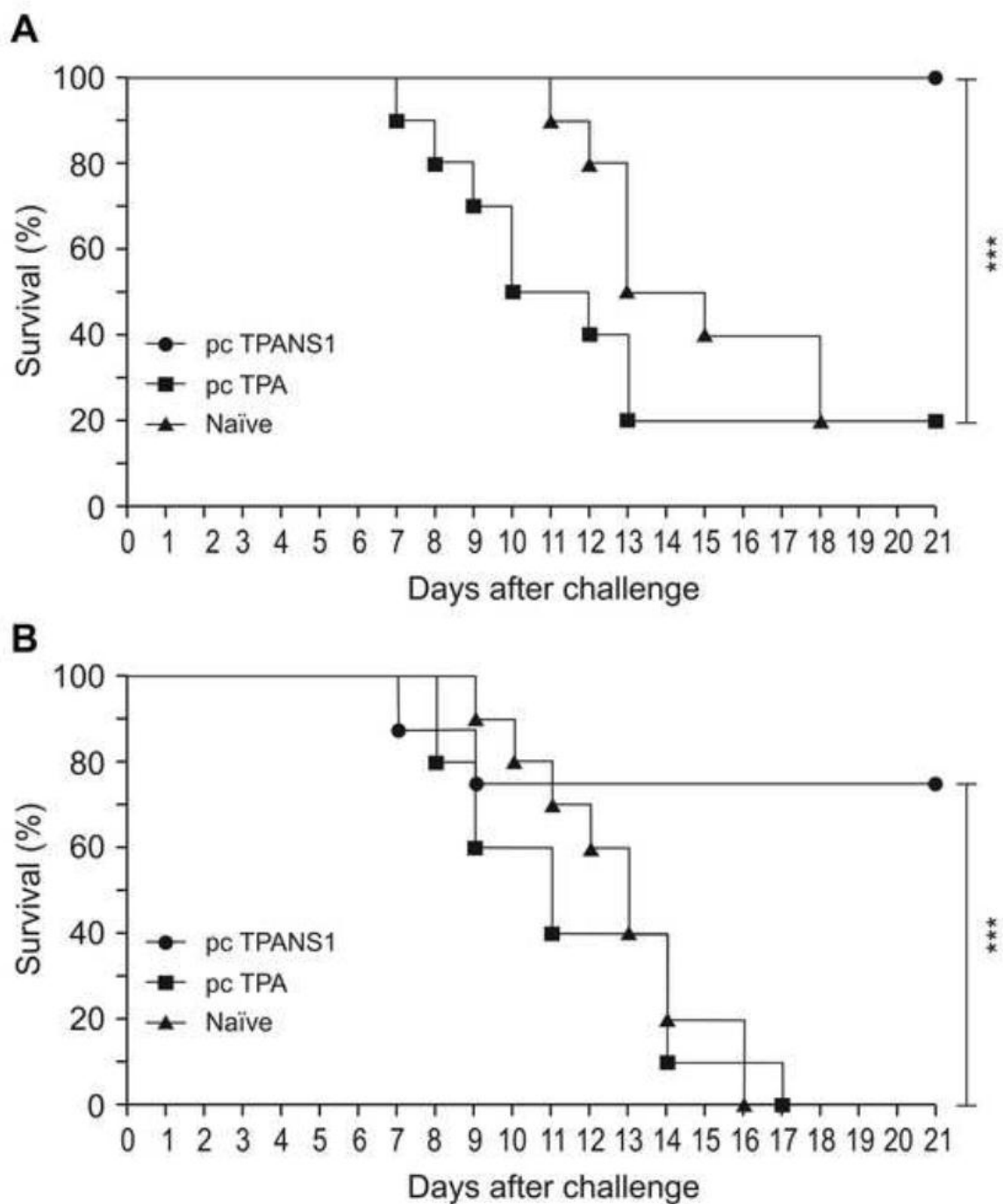


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

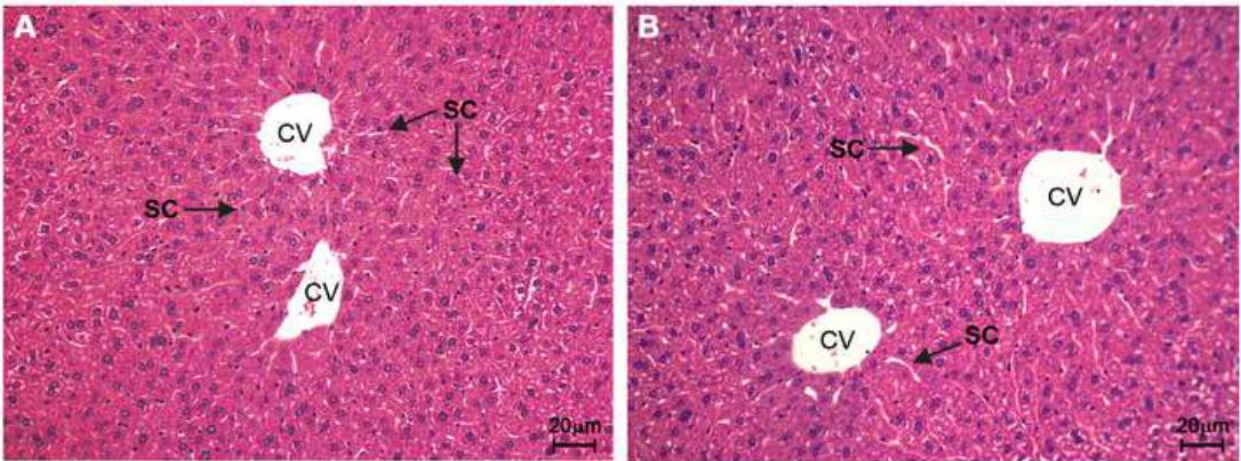


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

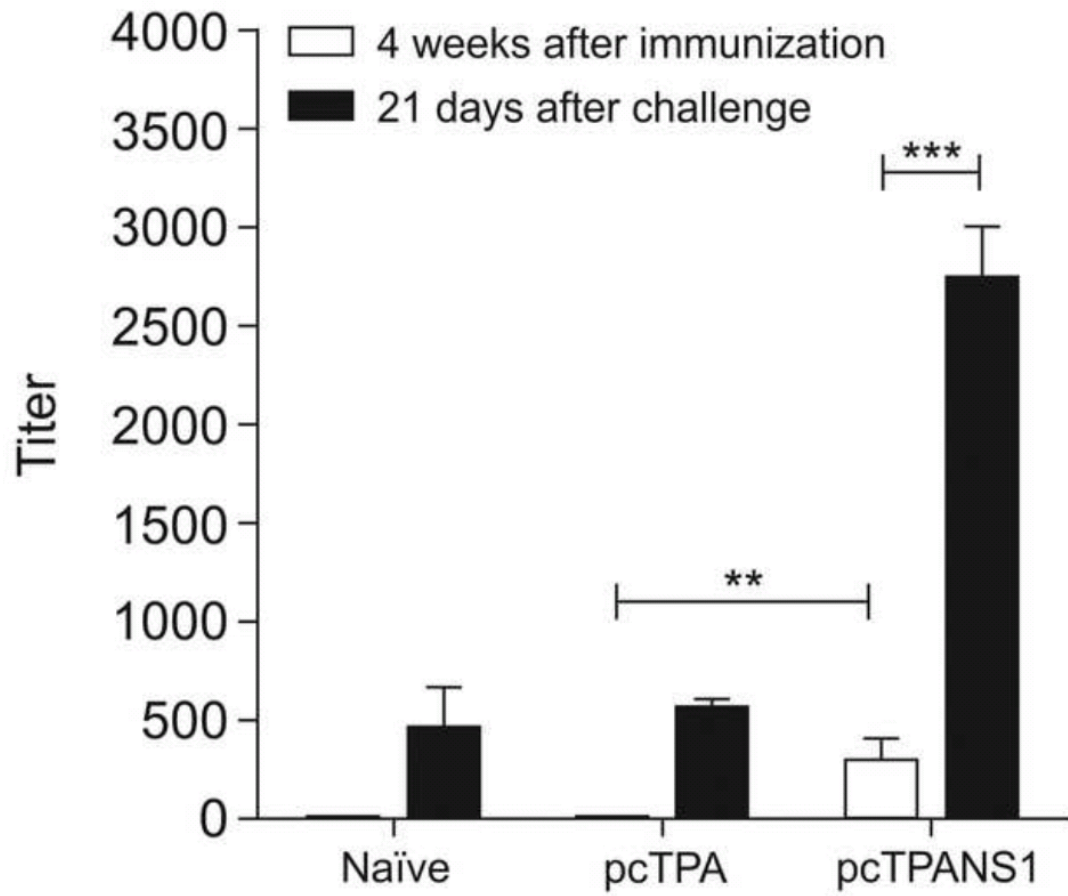


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

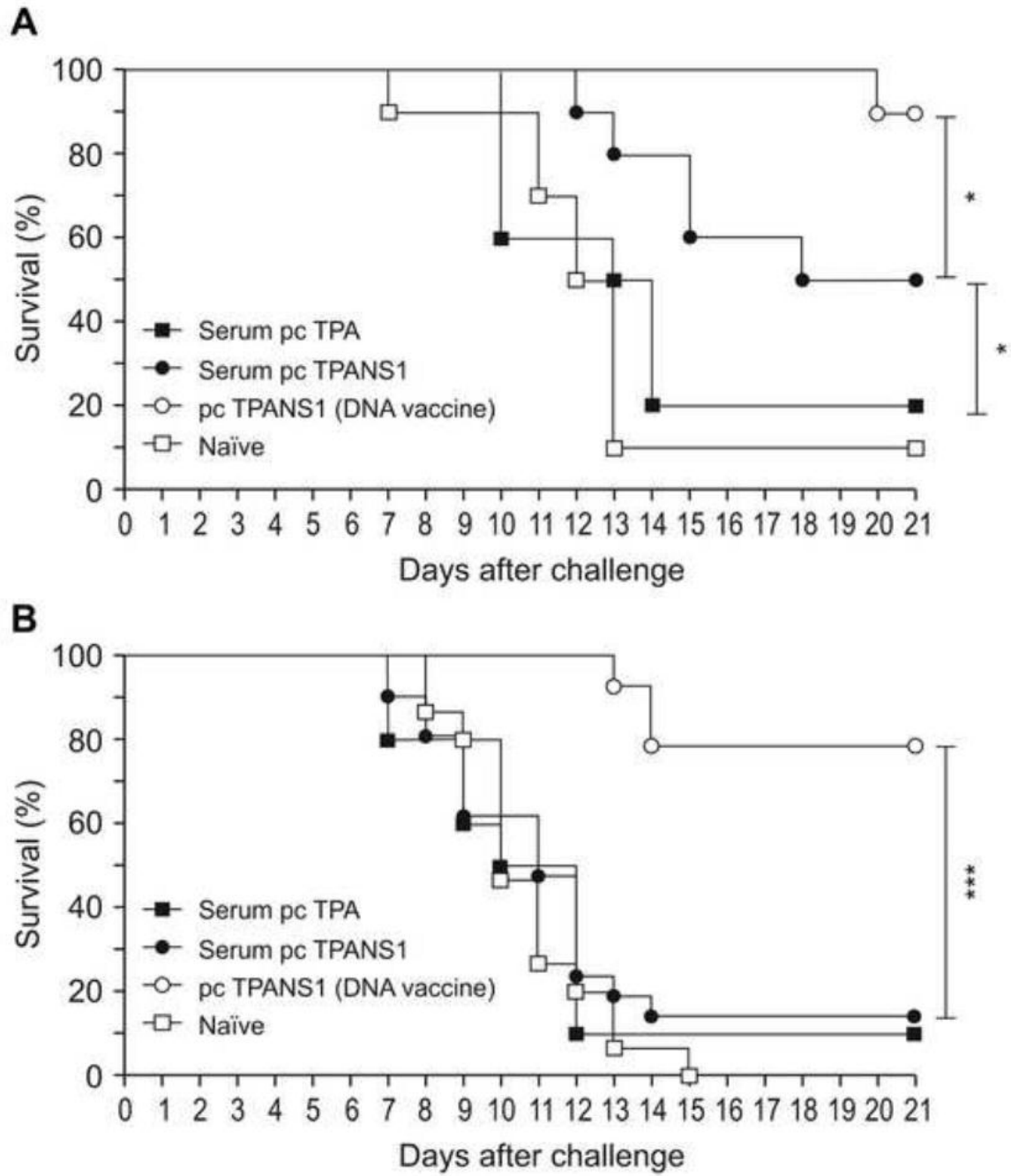


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

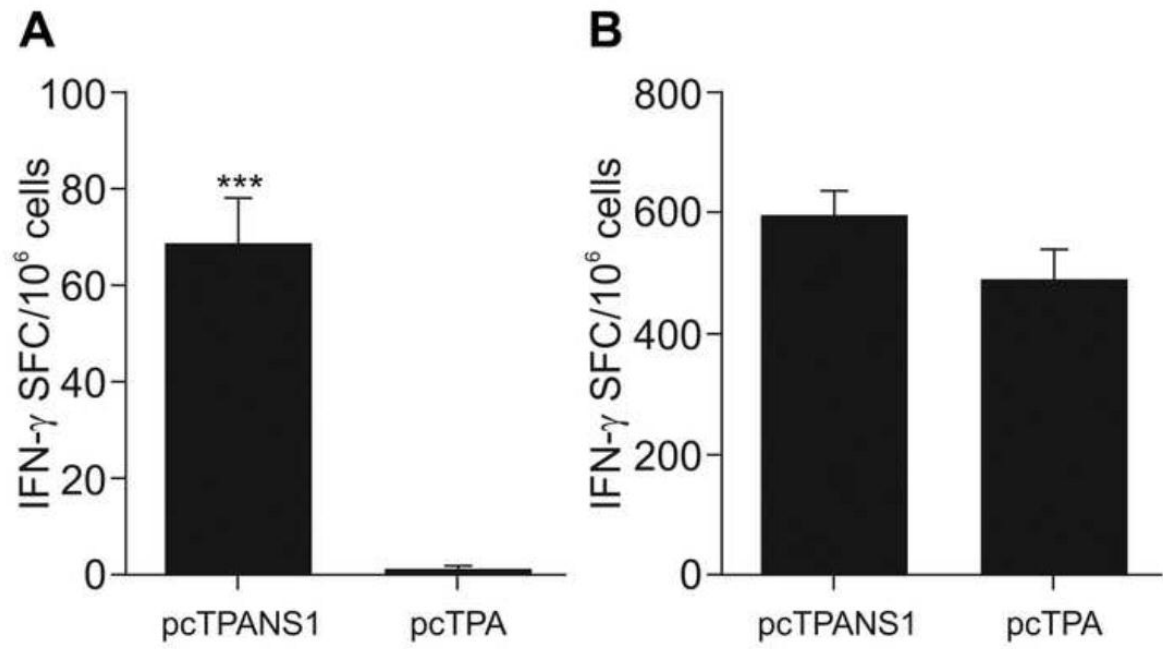


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

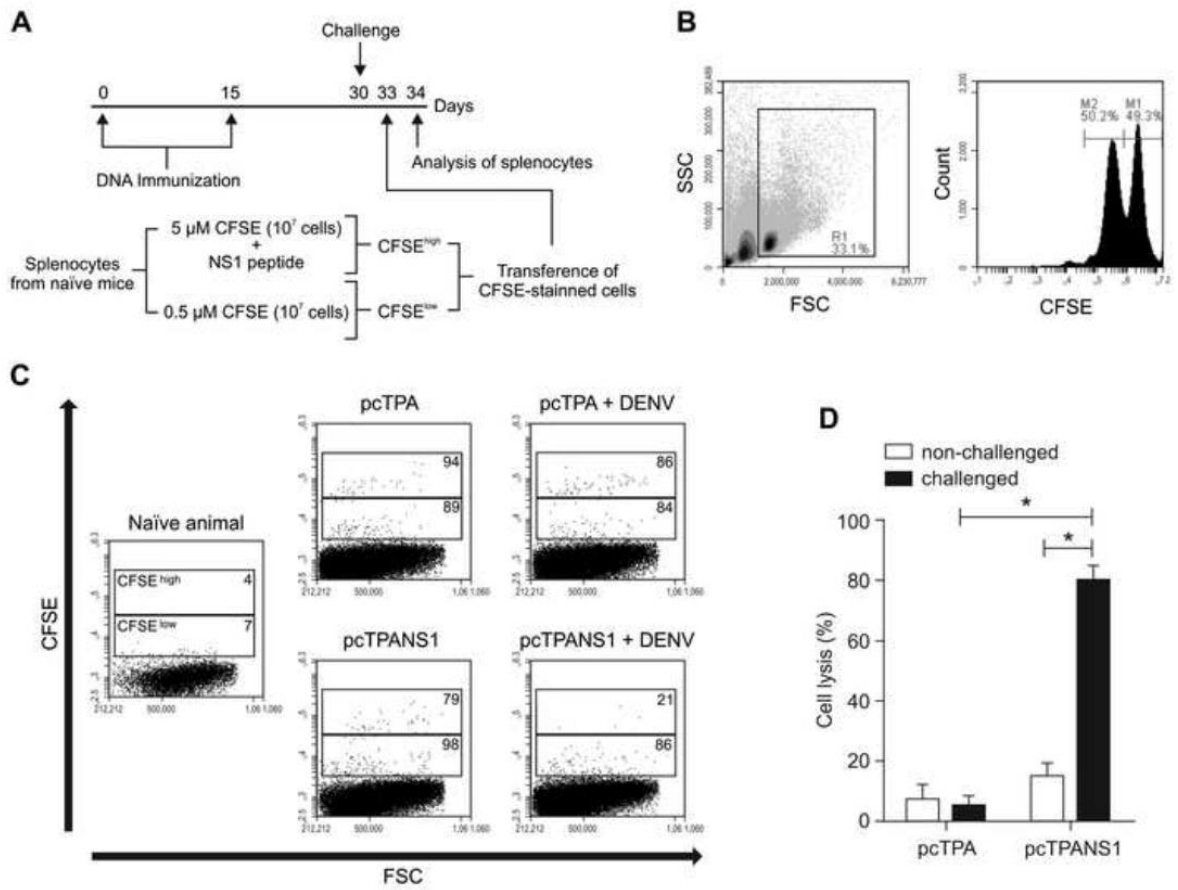


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

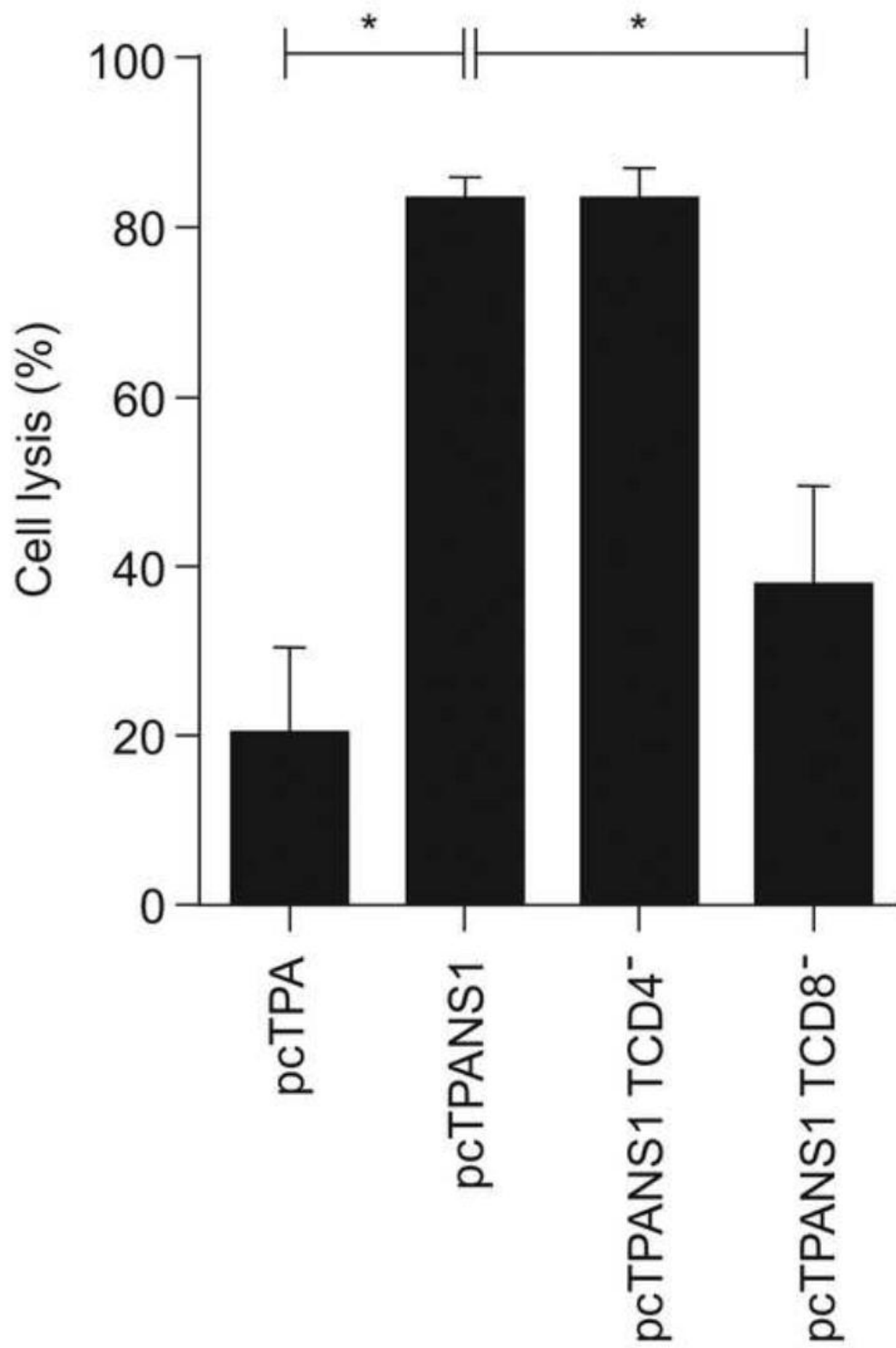


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

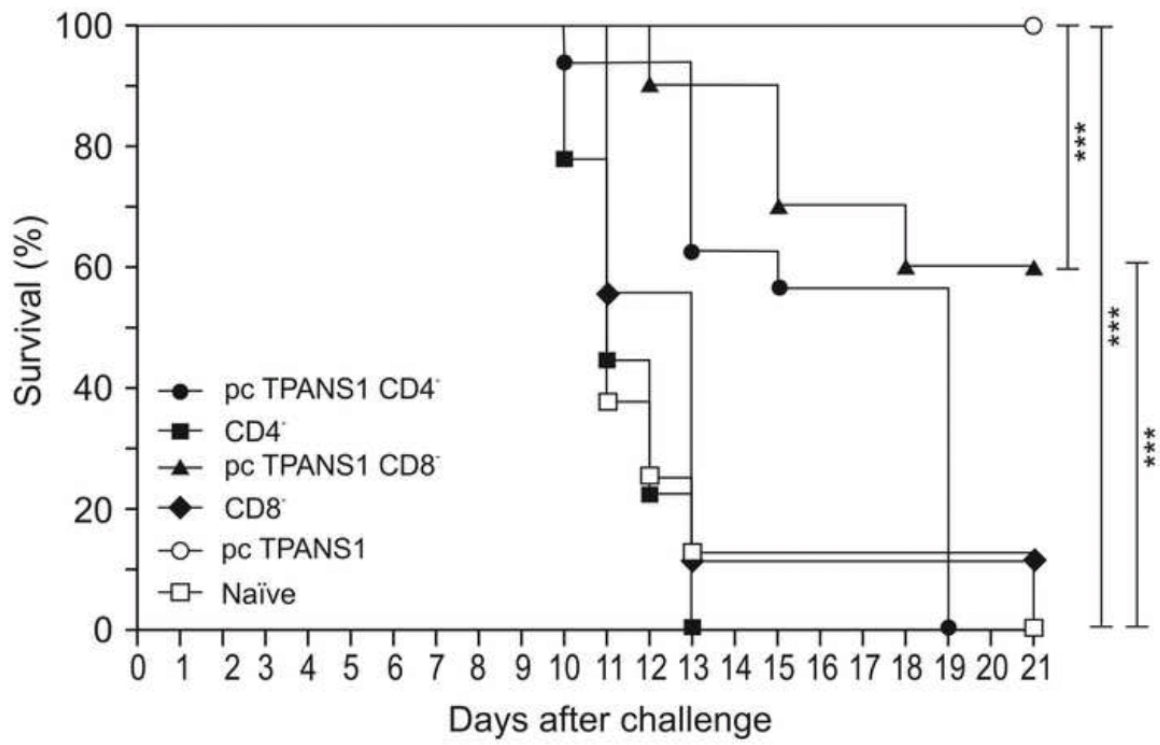


Figure 9
[Click here to download high resolution image](#)

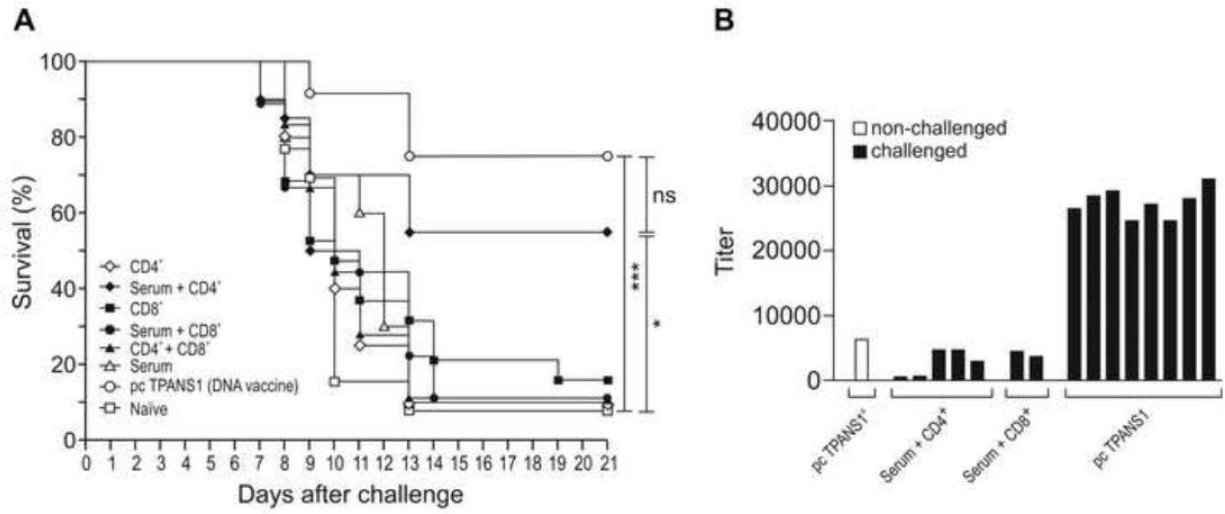


Figure S1

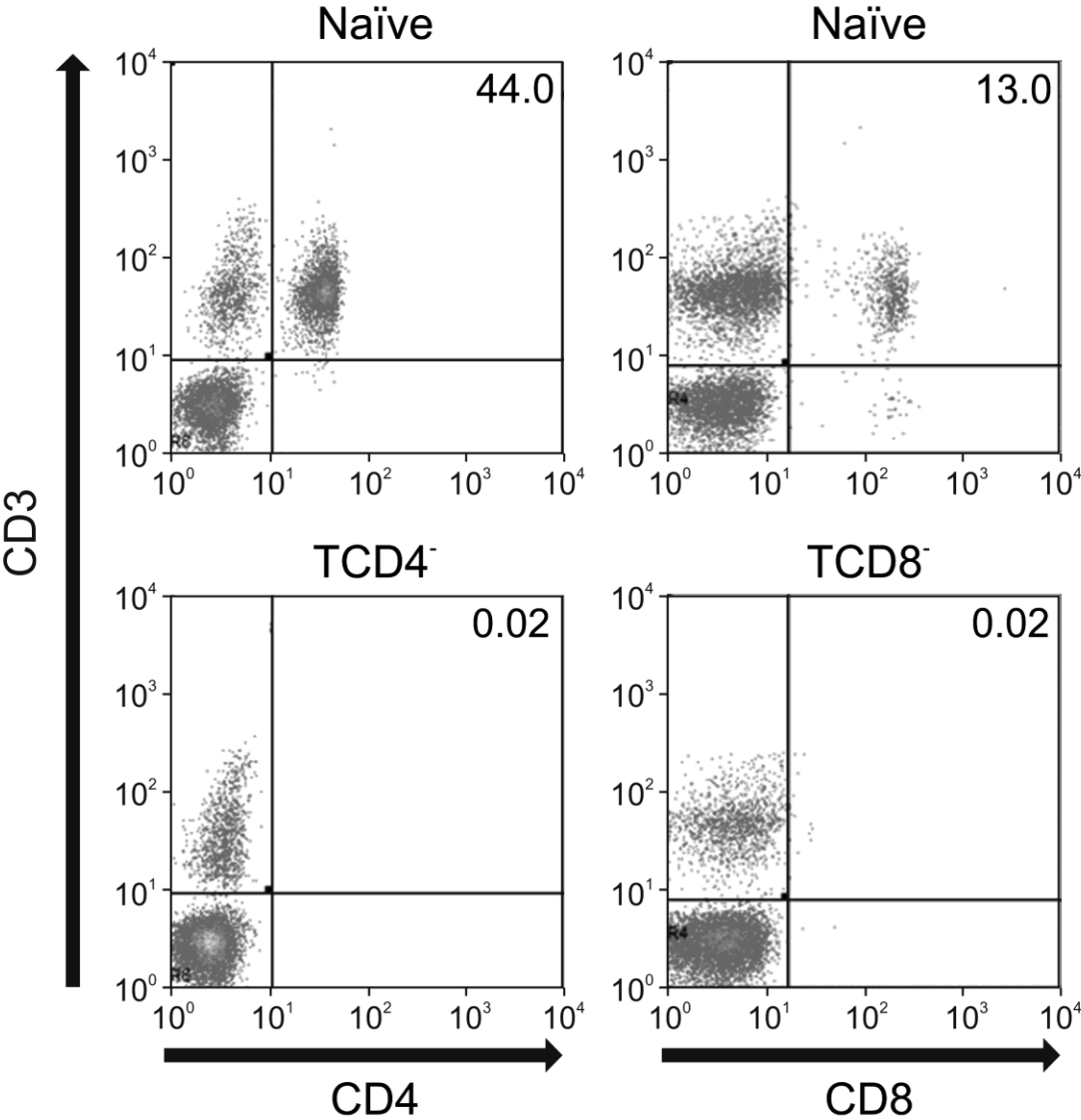


Table S1. Percentage of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ cells in depleted Balb/c mice.			
	Non-depleted (%)	CD4 depletion (%)	CD8 depletion (%)
CD4 ⁺	44.3	0.02 (99.9)*	30.1
CD8 ⁺	13.2	25.0	0.02 (99.8)*
* values between parenthesis correspond to percentages of depletion			

Table S2. Percentage of CD4 ⁺ and TCD8 ⁺ T cells in enriched populations from Balb/c mice.			
	Splenocytes (%)	CD4 ⁺ enriched population (%)	CD8 ⁺ enriched population (%)
CD4 ⁺	34.4	58.5	0.06 (99.8)*
CD8 ⁺	13.3	2.04 (84.6)*	31.5
B220 ⁺	41.4	4.1 (90.1)*	4.1 (90.1)*
* values between parenthesis correspond to the percentage of non-target cell depletion in the enriched population			