

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Paolla Beatriz de Almeida Pinto

**Resposta imune gerada com vacinas de DNA codificando
diferentes domínios da proteína E de dengue 2, associada
ou não à proteína NS1**

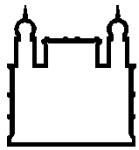
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Paolla Beatriz de Almeida Pinto

Resposta imune gerada com vacinas de DNA codificando
diferentes domínios da proteína E de dengue 2, associada
ou não à proteína NS1

ORIENTADORA: Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Aprovada em: 13/04/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto – IOC/Fiocruz (RJ)

Prof. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo – IOC/Fiocruz (RJ)

Prof. Dra. Luciana Jesus da Costa – UFRJ (RJ)

Prof. Dra. Tatiana Maron Gutierrez – IOC/Fiocruz (RJ)

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyhrro – UFRJ (RJ)

Rio de Janeiro, 13 de Abril de 2018

PINTO, PAOLLA BEATRIZ DE ALMEIDA.

Resposta imune gerada com vacinas de DNA codificando diferentes domínios da proteína E de dengue 2, associada ou não à proteína NS1 / PAOLLA BEATRIZ DE ALMEIDA PINTO. - Rio de Janeiro, 2018.

xvii, 114f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: ADA MARIA DE BARCELOS ALVES.

Bibliografia: f. 88-114

1. Dengue. 2. Vacina de DNA. 3. Envelope. 4. NS1. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho e todas as minhas demais conquistas à minha mãe, Deinha, e minha irmã Lívy, incondicionais investidoras na minha felicidade e sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, base e alicerce de todo o meu ser. Obrigada, Senhor, por me conduzir e sustentar infinitamente a cada etapa desta jornada. Minha vitória é Tua! E, também, a Nossa Senhora das Graças pela poderosa intercessão na minha vida. Obrigada, Mãezinha do Céu, por me carregar no colo durante esta caminhada!

À minha mãe, Andréa, por sua infinita confiança no meu sucesso. Obrigada por todos momentos dedicados a mim, pelo cuidado, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, e pela amizade. Espero que todo seu investimento na minha criação e educação tenha frutificado em orgulho e satisfação.

À minha irmã e melhor amiga, Lívy! Persiste em mim a intenção de ser exemplo no seu crescimento, mesmo que você já esteja crescida e até maior do que eu! Obrigada por me inspirar e ensinar o mais puro sentido do amor fraterno. Você é minha certeza de vida!

Ao meu pai, Paulo Sérgio (*in memoriam*), que será meu eterno herói. Seria um presente tê-lo por perto neste momento. O tempo foi curto demais, meu pai. Você faz muita falta! Espero que sinta orgulho das minhas pequenas conquistas.

À toda minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora, Dra. Ada, por depositar em mim a confiança necessária para desenvolver este projeto desde o início. Sou muito grata pela sua disponibilidade e paciência para me conduzir nesta jornada. Admiro sua postura, competência e dedicação neste papel árduo da orientação! Obrigada pelo investimento na minha formação profissional e por todo carinho! Para não perder o costume: rumo ao doutorado!

À minha co-orientadora, Dra. Simone, por ter me acompanhado diariamente durante a realização deste trabalho. Obrigada por abraçar sem hesitação o encargo de me orientar desde o início, sempre com muito carinho e paciência (principalmente quando eu não sabia nem o que era pipetar)! Você foi e continua sendo um exemplo fundamental para meu crescimento pessoal e profissional. Sou abundantemente grata por sua amizade e por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório!

À Dra. Adriana Azevedo pela colaboração nos ensaios iniciais de soroneutralização.

Ao Dr. Antônio Gonçalves pela ajuda nos experimentos iniciais com animais.

Ao Dr. Bernardo, pessoa incrível, pela companhia diária. Obrigada por toda ajuda, paciência e contribuição para o desenvolvimento deste projeto, mesmo quando eu mesma tinha minhas dúvidas. Sua amizade tornou cada dia de trabalho mais leve e prazeroso!

À Dr. Kátia Quaresma, pela ajuda durante os experimentos com animais. Você foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho!

Agradeço aos meus companheiros de laboratório: Maysa, Ágatha, Lauro, Jéssica e Camila pela ajuda, carinho e convivência durante esses anos.

Ao Dr. Luís Carlos Ferreira por ceder a proteína recombinante DIII. Agradeço a colaboração!

À Dra. Silvia Boscardin por ceder a proteína recombinante E80. Agradeço a colaboração!

Ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (PGBCM/Fiocruz) pela competência na formação acadêmica e científica dos seus alunos.

À Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ, mais especificamente às plataformas de ELISPOT e Sequenciamento de DNA, pelo suporte.

Ao Biotério de Experimentação do Pavilhão Leônidas Deane e toda a sua equipe pelo auxílio e apoio.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste trabalho.

À Dra. Tatiana Maron por sua disponibilidade e colaboração durante a revisão desta dissertação!

Aos membros da banca examinadora, por terem atendido ao convite, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar e contribuir para conclusão deste trabalho.

Aos amigos Natália, Anna e Thiago, presentes que a graduação me deu! Obrigada pela amizade e carinho! Tenho boas lembranças da época da faculdade e fico feliz por estarmos juntos até hoje, compartilhando nossas conquistas. Amo vocês!

À amiga Nathalia Furtado, companheira de graduação e pós-graduação! Obrigada pelo auxílio na análise computacional! Sou grata pela sua amizade, pelo apoio e carinho durante os processos seletivos (mesmo quando competíamos pela mesma vaga), disciplinas e congressos. Fico feliz por caminharmos lado a lado nessa aventura!

Aos amigos, Márcio e Kíssila, pessoas incríveis que deixaram saudades!

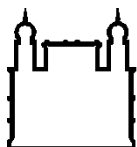
À minha amiga de toda vida, Bianca, pelo apoio e inspiração. Apesar da distância, fruto da rotina corrida, você foi e sempre será fundamental, amiga. Te amo e sinto orgulho por contar com sua amizade até hoje!

À amiga Thais Souza, pela paciência, sustento e companhia do dia a dia. Obrigada pela amizade, confiança e, principalmente, por me acompanhar no caminho da fé. Você é um presente de Deus. Te amo!

A todas as pessoas que colaboraram de uma forma ou de outra para minha caminhada durante a descoberta da ciência!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é nada mais que uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A dengue representa um problema de saúde pública mundial. O agente etiológico desta enfermidade é o vírus da dengue (DENV) que compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV1-4. A proteína do envelope (E) é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (AcN). Entretanto, ainda não se sabe exatamente quais domínios dessa proteína contribuem mais eficientemente na produção desses anticorpos. Nosso grupo desenvolveu várias vacinas de DNA contra dengue, incluindo o plasmídeo pE1D2, que possui a sequência que codifica o ectodomínio (domínios I, II e III) da proteína E de DENV2. Esta vacina induziu uma resposta imune protetora contra DENV2 em camundongos BALB/c. A proteína não estrutural 1 (NS1) também é apontada como possível antígeno protetor contra DENV. Nosso grupo construiu a vacina de DNA pTPANS1 que também se mostrou bastante protetora. Baseado nestes dados, construímos um plasmídeo, pNS1/E/D2, que contém os genes que codificam ambas proteínas, NS1 e E, sob o controle de promotores distintos. Assim, este trabalho tem como objetivos caracterizar a resposta imune humoral e celular gerada pela vacina de DNA pE1D2 e estudar a vacina pNS1/E/D2 em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, os anticorpos anti-DIII (domínio III da proteína E) foram depletado do soro de camundongos imunizados com pE1D2. Os níveis de AcN foram avaliados por ensaios de redução de plaque e os anticorpos direcionados contra epítomos contidos nos DI/II foram mais neutralizantes do que os que reconhecem o DIII. Além disso, anticorpos anti-DIII interferiram negativamente na neutralização mediada pelos anticorpos anti-DI/II. Em paralelo, foi construída uma nova vacina de DNA (pE3D2) contendo apenas a sequência que codifica os domínios I e II da proteína E. Tal plasmídeo gerou proteção parcial em ensaios *in vivo* de imunização e desafio com DENV2. Posteriormente, a resposta imune celular induzida com pE1D2 foi avaliada através de ELISPOT frente ao estímulo com uma biblioteca de peptídeos contida na proteína E. Cinco peptídeos foram identificados como potenciais epítomos antigênicos envolvidos na resposta imune mediada por pE1D2 e mais dois também se mostraram imunogênicos após o desafio com DENV2. Em relação à vacina pNS1/E/D2, a análise por imunofluorescência de células transfectadas com clones deste plasmídeo revelou que a expressão de NS1 foi inferior à expressão da proteína E. Tais resultados se refletiram também na análise da resposta imune. O ensaio de ELISA revelou níveis mais elevados de anticorpos anti-E do que anti-NS1 nos animais imunizados com o pNS1/E/D2 quando comparados aos controles. Além disso, a análise da resposta imune celular através de ELISPOT demonstrou que os esplenócitos de animais imunizados com pNS1/E/D2 foram reativos a peptídeos sintéticos presentes nas proteínas E e NS1. Porém, a ativação celular mediante estímulo com peptídeo contido na proteína NS1 foi maior nos animais que receberam a vacina pTPANS1. Em ensaios de imunização e desafio com DENV2, o plasmídeo pNS1/E/D2 se mostrou bastante protetor, uma vez que os camundongos imunizados não apresentaram sinais clínicos da infecção. Como conclusão, observamos que a combinação com os plasmídeos pE1D2 e pTPANS1 foi mais protetora que os plasmídeos isolados e os anticorpos gerados contra os domínios I e II foram mais neutralizantes.

ABSTRACT

Dengue represents a global public health problem. The etiologic agent of this disease is the dengue virus (DENV) comprising four antigenically distinct serotypes: DENV1-4. The envelope (E) protein is the major target for neutralizing antibodies (NAb). However, it is not exactly well known yet which domains of this protein contribute more efficiently in the production of these antibodies. Our group has developed several DNA vaccines, including the plasmid pE1D2, which has the ectodomain sequence (domains I, II and III) of E protein of DENV2. This plasmid induced a protective immune response against DENV2 in BALB/c mice. The nonstructural protein 1 (NS1) is also indicated as a possible protective antigen against DENV. Our group constructed the DNA vaccine pcTPANS1 that showed to be protective. Based on this data, we constructed a plasmid, named pNS1/E/D2, which contains the genes encoding both proteins, E and NS1, under the control of distinct promoters. Therefore, this work aims to characterize the humoral and cellular immune response generated by the pE1D2 DNA vaccine and to continue *in vitro* and *in vivo* studies with the pNS1/E/D2 vaccine. Initially, anti-DIII (domain III of the E protein) antibodies were depleted from serum of mice immunized with pE1D2. NAb levels were assessed by plaque reduction assays and the antibodies directed to epitopes contained in DI/II were more neutralizing than those directed to DIII. In addition, anti-DIII antibodies interfered negatively in neutralization mediated by antibodies directed to DI/II. In parallel, a new DNA vaccine (pE3D2) containing only the sequence coding for the domain I and II of E protein was constructed. Such plasmid generated partial *in vivo* protection after immunization and challenge assays with DENV2. In addition, the cellular immune response induced with pE1D2 was evaluated by ELISPOT upon stimulation with a peptide library contained in the E protein. Five peptides were identified as potential antigenic epitopes involved in the immune response mediated by pE1D2 and two more peptides also shown to be immunogenic after challenge with DENV2. Regarding the pNS1/E/D2 vaccine, immunofluorescence analysis of cells transfected with clones of this plasmid revealed that NS1 expression was inferior to the expression of the E protein. These results were also reflected in the analysis of the immune response. The ELISA assay revealed higher levels of anti-E than anti-NS1 antibodies in animals immunized with pNS1/E/D2 as compared to controls. In addition, analysis of the cellular immune response through ELISPOT demonstrated that splenocytes from animals immunized with pNS1/E/D2 were reactive to synthetic peptides present in E and NS1 proteins. However, cellular activation by stimulation with peptide contained in NS1 protein was greater in animals receiving pcTPANS1 vaccine. In immunization and challenge trials with DENV2, the plasmid pNS1/E/D2 was shown to be highly protective, since immunized mice showed no clinical signs of infection. In conclusion, we found that the combination with the plasmids pE1D2 and pcTPANS1 was more protective than the isolated plasmids and the antibodies raised against domains I and II were more neutralizing.

ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp R	gene que confere resistência a ampicilina
AcN	Anticorpos neutralizantes
ADE	Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês <i>antibody dependent enhancement</i>)
BHK-21	Célula de rim de hamster neonato (do inglês, <i>baby hamster kidney</i>)
BGH	Hormônio de crescimento bovino (do inglês <i>bovine growth hormone</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CD	Marcador de membrana (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	Do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMV	Citomegalovírus
CMV pro	Promotor derivado do citomegalovirus
ColE1ori	Origem de replicação de <i>Escherichia coli</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanina
DENV	Vírus Dengue
D.O.	Densidade ótica
DI/II	Domínios I e II da proteína E de DENV2
DIII	Domínios III da proteína E de DENV2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
GPI	Glicosil-Fosfatidil-Inositol
GRP78	Do inglês <i>endoplasmatic reticulum chaperone</i>
HLA	Antígenos leucocitários humanos (do inglês <i>human leukocyte antigen</i>)
i.c	Intracerebral
i.d.	Intradérmica
i.m	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LD ₅₀	Dose letal para 50 % da população em teste (do inglês: <i>lethal doses 50 %</i>)
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (do inglês <i>major histocompatibility complex</i>)
NS	Proteína não estrutural
NS1	Proteína não estrutural 1
PBS	Tampão fosfato salino
pcTPA	Vetor construído a partir do plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen) que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante do sítio de clonagem
pcTPANS1	Plasmídeo construído a partir do plasmídeo pcTPA, contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante ao gene <i>ns1</i> de DENV2, cepa Nova Guiné
pE1D2	Plasmídeo construído a partir do plasmídeo pcTPA, que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA a montante ao

	ectodomínio da proteína E de DENV2, cepa Nova Guiné
pE2D2	Plasmídeo construído a partir do plasmídeo pcTPA, que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante da sequência que codifica o DIII da proteína E de DENV2, cepa Nova Guiné
pE3D2	Plasmídeo construído a partir do plasmídeo pcTPA, contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante da sequência que codifica o DI/II da proteína E de DENV2, cepa Nova Guiné
pNS1/E/D2	Plasmídeo que contém as sequências que codificam a proteína NS1 e o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV2, cepa Nova Guiné, ambas fusianadas à sequência do peptídeo sinal t-PA cepa
PFU	unidade formadora de placa (do inglês, <i>plaque forming unit</i>)
PPR	Do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
prM	Precursor da proteína de membrana
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína de membrana
Proteína NS1	Proteína não estrutural 1
PRNT	Do inglês, <i>plaque reduction neutralization test</i>
pSV40 pro	Promotor derivado do Símio-vírus 40
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>)
t-PA	ativador de plasminogênio de tecido humano
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

Lista de figuras

Figura 1.1	Mapa de risco da dengue no mundo.....	02
Figura 1.2	Ciclo de replicação do DENV.....	06
Figura 1.3	Estrutura e genômica do DENV.....	07
Figura 1.4	Ciclo de replicação do DENV.....	09
Figura 1.5	Representação da proteína E e seus domínios.....	12
Figura 1.6	Representação da proteína E.....	13
Figura 1.7	Representação esquemática do mecanismo de ADE.....	16
Figura 1.8	Representação esquemática da célula transfectada com vacina de DNA.....	23
Figura 3.1	Representação esquemática dos plasmídeos pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2, e pcTPA.....	30
Figura 3.2	Representação esquemática do plasmídeo pE3D2.....	31
Figura 3.3	Esquema da imunização e desafio com DENV2 neuroadaptado.....	34
Figura 4.1	Resposta de IgG no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (primeiro experimento).....	42
Figura 4.2	Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (primeiro experimento).....	43
Figura 4.3	Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (segundo experimento).....	44
Figura 4.4	Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (segundo experimento).....	45
Figura 4.5	Resposta de anticorpos que reconhecem o DIII íntegro ou desnaturado no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII.....	46
Figura 4.6	Seleção de pools de peptídeos imunorreativos contidos na proteína E após imunização com a vacina de DNA pE1D2.....	47

Figura 4.7	Identificação (A) e confirmação (B) de peptídeos imunorreativos contidos na proteína E após abertura dos pools 4, 8 e 9.....	49
Figura 4.8	Seleção de pools de peptídeos imunorreativos contidos na proteína E através da quantificação de células produtoras de IFN- γ após imunização com a vacina de DNA pE1D2 e desafio com DENV2.....	51
Figura 4.9	Identificação (A-B) e confirmação (C) de peptídeos imunorreativos contidos na proteína E após abertura dos pools 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10...	53
Figura 4.10	Localização dos peptídeos 40, 71, 75, 82, 83, 86 e 98 na estrutura dimérica do ectodomínio da proteína E.....	54
Figura 4.11	Eletroforese em gel de agarose da digestão de dois clones de pE3D2 e do controle pcTPA com as enzimas de restrição <i>EcoR</i> V e <i>Xho</i> I.....	56
Figura 4.12	Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE3D2.....	57
Figura 4.13	Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pE3D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado.....	59
Figura 4.14	Deteção das proteínas E e NS1 em células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pNS1/E/D2 e seus controles.....	61
Figura 4.15	Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado....	64
Figura 4.16	Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com o clone 5 do pNS1/E/D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado.....	66
Figura 4.17	Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA antes do desafio com DENV2.....	67
Figura 4.18	Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA.....	68
Figura 4.18	Resposta imune celular induzida pela imunização com a vacina de DNA pNS1/E/D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A dengue.....	2
1.2	Dengue no Brasil.....	3
1.3	Manifestações clínicas da doença.....	4
1.4	O vírus Dengue.....	5
1.4.1	Estrutura viral.....	5
1.4.2	Ciclo de replicação.....	7
1.5	Proteínas virais.....	9
1.5.1	Proteína E.....	11
1.5.2	Proteína NS1.....	13
1.6	Resposta imune.....	14
1.7	Vacinas contra dengue em fase pré-clínica e clínica.....	17
1.8	Vacinas de DNA.....	21
1.8.1	Vacinas de DNA contra dengue.....	23
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Lista de meios e tampões de uso recorrente.....	29
3.2	Plasmídeos pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2, pcTPA construídos anteriormente.....	30
3.3	Construção do plasmídeo pE3D2.....	31
3.4	Purificação dos plasmídeos recombinantes.....	31
3.5	Transfecção de células BHK-21.....	32
3.6	Imunofluorescência indireta.....	33
3.7	Imunização de camundongos com as vacinas de DNA e desafio por via intracerebral.....	33
3.8	Depleção dos anticorpos anti-DIII da proteína E de DENV2.....	35
3.9	Ensaio de ELISA.....	36
3.10	Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT ₅₀).....	35
3.11	Ensaio de ELISPOT.....	37
3.12	Análise computacional da localização dos peptídeos.....	39

3.13	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Resposta imune gerada com uma vacina de DNA baseada no ectodomínio da proteína E (pE1D2).....	40
4.1.1	Análise da resposta de anticorpos neutralizantes após depleção de anticorpos específicos contra o domínio III da proteína E.....	41
4.1.2	Avaliação da resposta imune celular em camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ	46
4.1.2.1.	Avaliação da resposta celular em camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 e desafiados com DENV2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ	50
4.1.2.2.	Compilação dos dados da resposta imune celular mediada pela vacina de DNA pE1D2.....	54
4.1.2.3.	Localização dos peptídeos identificados na estrutura da proteína E.....	54
4.2.	Vacina de DNA baseada nos domínios I e II (pE3D2).....	55
4.2.1.	Construção e avaliação da integridade da vacina de pE3D2.....	55
4.2.2.	Análise da resposta de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pE3D2.....	56
4.2.3.	Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com pE3D2 e desafiados com DENV2 por via intracerebral.....	57
4.3.	Vacina de DNA contendo simultaneamente os genes E e NS1 de DENV2.	60
4.3.1.	Expressão in vitro das proteínas recombinantes E e NS1 mediada pelo plasmídeo pNS1/E/D2.....	60
4.3.2.	Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com pNS1/E/D2 e desafiados por via intracerebral.....	62
4.3.2.1.	Novo teste de proteção e desafio em camundongos BALB/c imunizados com o clone 5 do plasmídeo pNS1/E/D2.....	65
4.3.3.	Análise de resposta de anticorpos contra as proteínas E e NS1 nos camundongos imunizados com pNS1/E/D2.....	67
4.3.3.1.	Análise de resposta de anticorpos neutralizantes presentes no soro dos camundongos imunizados com pNS1/E/D2.....	68

	4.3.4. Avaliação da resposta imune celular dos camundongos imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ	69
5	DISCUSSÃO.....	71
	5.1. Avaliação da resposta imune do plasmídeo pE1D2.....	72
	5.2. Avaliação da resposta imune do plasmídeo pE3D2.....	76
	5.3. Vacina de DNA contendo simultaneamente os genes E e NS1 de DENV2.....	77
6	CONCLUSÕES.....	83
7	PERSPECTIVAS.....	86
8	REFERÊNCIAS.....	88

1. Introdução

1. Introdução

1.1. A dengue

A dengue é uma das mais relevantes arboviroses humanas, transmitida aos seres humanos pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor da doença nas Américas (Laughlin *et al*, 2012; Pless *et al*, 2017). O vírus da Dengue (DENV) pertence ao gênero Flavivírus e à família *Flaviviridae*, juntamente com outros vírus de importância médica como o vírus do oeste do Nilo (WNV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da Zika (ZIKV) dentre outros. O DENV compreende quatro sorotipos antígenicamente distintos, mas que estão intimamente relacionados: DENV1-4 (Henchal *et al*, 1990; Yung *et al*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência da dengue mundialmente aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos. Atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países e cerca de 2,5 bilhões de pessoas no mundo vivem em área de risco de infecção (WHO, 2016) (Figura 1.1). Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus da dengue todos os anos, com 96 milhões de casos de manifestação da doença e 20 mil óbitos (Bhatt *et al*, 2013).

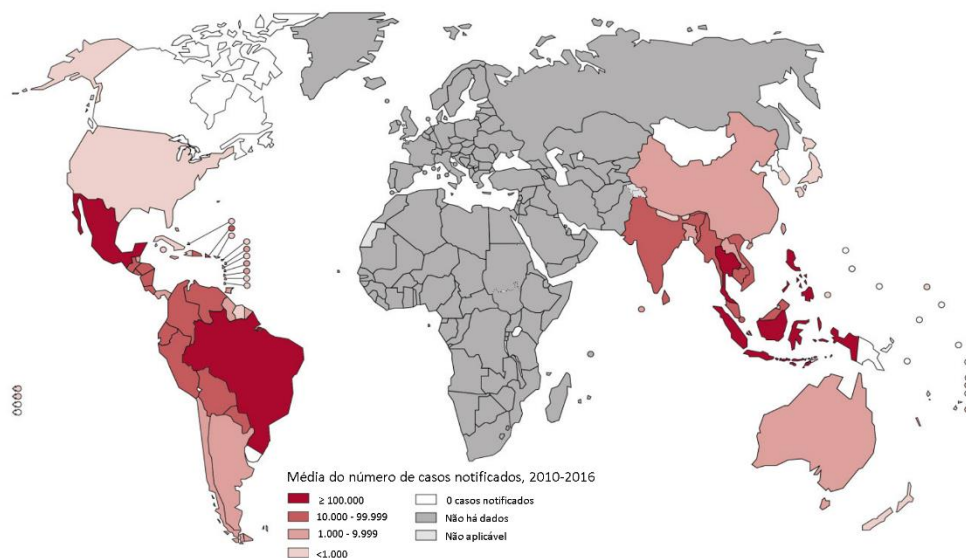


Figura 1.1: O mapa representa a ocorrência de casos de dengue suspeitos ou confirmados relatados a OMS de 2010 à 2016 (Adaptado de WHO, 2016).

O drástico alastramento da dengue nas últimas décadas representa um problema de saúde pública mundial, sobretudo devido às dificuldades enfrentadas no controle de epidemias recorrentes e o aumento do número de casos graves da doença. Desta forma,

é de suma importância a busca por estratégias preventivas que abarquem o controle vetorial e o desenvolvimento de vacinas protetoras (Rather *et al*, 2017). Recentemente, no final de 2015, uma vacina contra dengue (Dengvaxia, Sanofi Pasteur) foi licenciada para comercialização no Brasil e em outros países endêmicos (WHO, 2016). Entretanto, como será discutido mais a frente, a segurança e eficácia desta vacina tem sido constante alvo de críticas da comunidade científica (Halstead, 2018), impulsionando a investigação de métodos mais efetivos de controle da doença.

1.2. Dengue no Brasil

No continente americano, o Brasil é o país que apresenta o maior número de pessoas infectadas pelo DENV desde a década de 1908, contribuindo com mais de 60% dos casos reportados da doença (Nogueira *et al*, 2007; San Martín *et al*, 2010; Ramos-Castaneda *et al*, 2017).

O programa de erradicação do vetor *Ae. aegypti* (1950-1960), coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde, combateu a disseminação do vírus Dengue e, consequentemente, eliminou a doença no Brasil até 1976. Após a reintrodução do *Ae. Aegypti* no Brasil, a primeira evidência de surto da dengue com diagnóstico laboratorial foi registrada em 1981 no estado de Roraima com os sorotipos 1 e 4 do DENV, mas este surto foi rapidamente controlado (Osana *et. al*, 1983). Posteriormente, DENV1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro em 1986, se espalhando pelo país (Schatzmayr *et al*, 1986). Em 1990 DENV2 também foi introduzido no Rio de Janeiro, sendo responsável, junto com DENV1, pelo aparecimento das primeiras manifestações das formas graves da doença (Nogueira *et al*, 1990). No ano 2000, o DENV3 foi introduzido no Brasil, sendo responsável por grandes epidemias que se disseminaram por todo o país nos anos seguintes (Nogueira *et al*, 2005). Em 2010, o sorotipo 4 reapareceu na região Norte do país com casos notificados da doença nos estados de Roraima e Amazonas (Nogueira *et al*, 2011).

Desde então, os 4 sorotipos co-circulam no Brasil (Fares *et al*, 2015). Como resultado, epidemias recorrentes causadas por diferentes sorotipos virais contribuíram para uma mudança no perfil epidemiológico da dengue no Brasil. Nos anos de 2007 e 2008, verificou-se um deslocamento de faixa etária acometida pela dengue grave com um súbito aumento da incidência das formas mais graves entre indivíduos menores que

quinze anos. (Teixeira *et al*, 2009; Cavalcanti *et al*, 2011). Este cenário pode ser explicado pelo fato dos indivíduos de mais idade adquirirem imunidade contra os sorotipos circulantes enquanto os indivíduos mais jovens, que ainda não entraram em contato com o vírus, ficam mais susceptíveis à infecção (Teixeira *et al*, 2009, 2013; Coelho *et al*, 2008; Rodriguez-Barraquer *et al*, 2011; Buratinni *et al*, 2016). No ano de 2017, foi registrado um número menor ocorrência de dengue em relação aos anos anteriores, com 251.711 casos em todos o país. Já em 2018, até a meados de fevereiro, foram registrados 32.161 casos de dengue, dentre os quais a região sudeste apresentou a maior incidência (12.939 casos; 40,2%) (Portal da saúde – SUS, 2018).

Ademais, desde de 2016, o Brasil vem enfrentando a disseminação dos vírus vírus zika, chikungunya e, mais emergencialmente, da febre amarela, propiciando uma maior mobilização para vigilância epidemiológica de forma aprimorar a acurácia de diagnóstico e predição de novos surtos e epidemias.

1.3. Manifestações clínicas da doença

A infecção pelo DENV é majoritariamente assintomática, porém, quando sintomática, pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas as quais variam de acordo com as características do indivíduo e do vírus como: cepa e sorotipo viral, idade, etnia, estado imunológico, fatores genéticos e comorbidades (Ross, 2010; Nedjadi *et al*, 2015; Unnikrishnan *et al*, 2015).

Depois da inoculação do vírus através da picada do mosquito infectado, o tempo médio de incubação é de 4 a 10 dias. Após este período, a infecção pode ser subclínica ou apresentar sintomas clássicos da febre da dengue (FD) ou ainda evoluir para os quadros mais graves da doença, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque (SCD). A febre da dengue é a forma mais frequente da doença com duração de 2 a 7 dias e é caracterizada por febre, dor de cabeça e retro-orbital, dores musculares e articulares. Anorexia, náusea e vômitos também são comuns (WHO, 2012). A FHD apresenta sintomas similares aos da FD, porém há um agravamento do quadro com o aparecimento de manifestações hemorrágicas, trombocitopenia e extravasamento de plasma dos vasos para os tecidos (resultante do aumento da permeabilidade vascular). (Martina *et al*, 2009; WHO, 2012; Diamond, 2015). A SCD ocorre quando há uma diminuição crítica do volume sanguíneo decorrente do

extravasamento de plasma característico da FHD. Além dos quadros da FHD e SCD, há ainda outras formas graves da doença que podem culminar em óbito. Nesses casos, o indivíduo geralmente apresenta manifestações e síndromes neurológicas, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, hemorragia de mucosas, dentre outras, sendo necessária a assistência médica adequada e imediata (WHO, 2012; Kuczera *et al*, 2018).

Devido ao aumento do número de casos graves da doença que não se enquadravam aos critérios vigentes na época, foi proposta uma nova classificação da dengue, com o objetivo de aprimorar a identificação e manejo clínico emergencial de indivíduos acometidos pelas formas graves da doença (WHO, 2009). Essa nova classificação divide as manifestações clínicas da dengue em: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave. Nesse novo critério, os sinais de alerta são determinados como: dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluido (ascite ou efusão pleural), sangramento de mucosas, letargia e hepatomegalia, além de trombocitopenia exacerbada. Apesar disso, a classificação em FD/FHD/SCD ainda é amplamente empregada na clínica (WHO, 2009).

1.4. O vírus Dengue

1.4.1. Estrutura viral

A partícula viral, com cerca 50 nm de diâmetro, é constituída de um nucleocapsídeo e um envelope composto por uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático da célula infectada, na qual se inserem as proteínas de envelope (E) e membrana (M). O nucleocapsídeo é composto por múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) complexadas a uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva (Kuhn *et al*, 2002; Ma *et al*, 2004; Qi *et al*, 2008) (Figura 1.2).

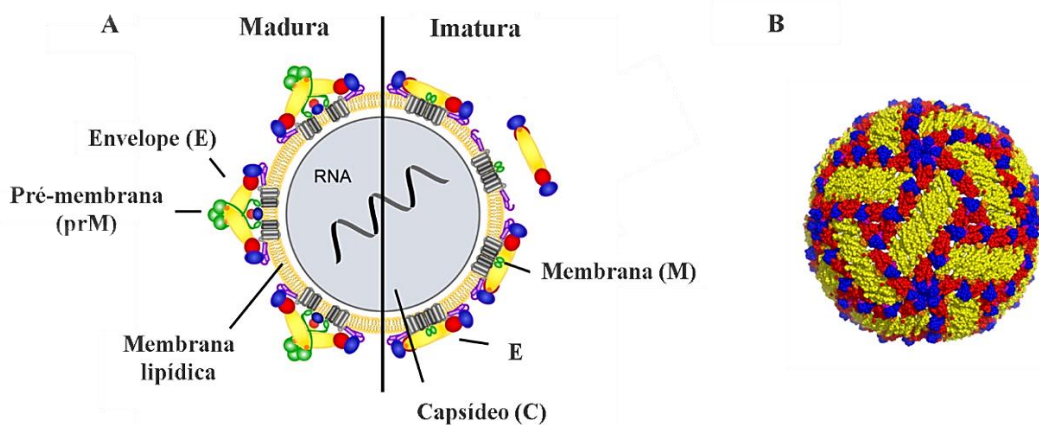


Figura 1.2: Representação esquemática do vírus Dengue. (A) Modelo esquemático de uma partícula de flavivírus. O capsídeo contém o RNA viral e múltiplas cópias da proteína C. A superfície das partículas é composta por heterodímeros das proteínas prM-E. A montagem das partículas virais imaturas ocorre no retículo endoplasmático. Antes de sua liberação pela célula, uma protease celular (furina) cliva a proteína pré-membrana (prM) e gera a proteína M, que fica associada à membrana, gerando os vírions maduros. (B) Representação da disposição dos dímeros E na superfície dos virions maduros de dengue. (Modificado de Vratskikh *et al*, 2013)

O RNA viral de aproximadamente 10,7 Kb possui em sua extremidade 5' a estrutura *cap* e é destituído de cauda poli-A na extremidade 3'. Esse genoma compreende um único quadro aberto de leitura que codifica uma poliproteína precursora das proteínas virais. No citoplasma da célula hospedeira, esta poliproteína é clivada por proteases celulares e viral (NS3 associada a NS2B), gerando dez proteínas: três proteínas estruturais [capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope E] e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), envolvidas no processo de replicação e montagem dos novos vírions (Figura 1.3). As regiões não codificantes 3' e 5' (3'UTR e 5'UTR) também são importantes para a regulação da replicação viral (Chambers *et al*, 1990; Qi *et al*, 2008; Martina, 2014).

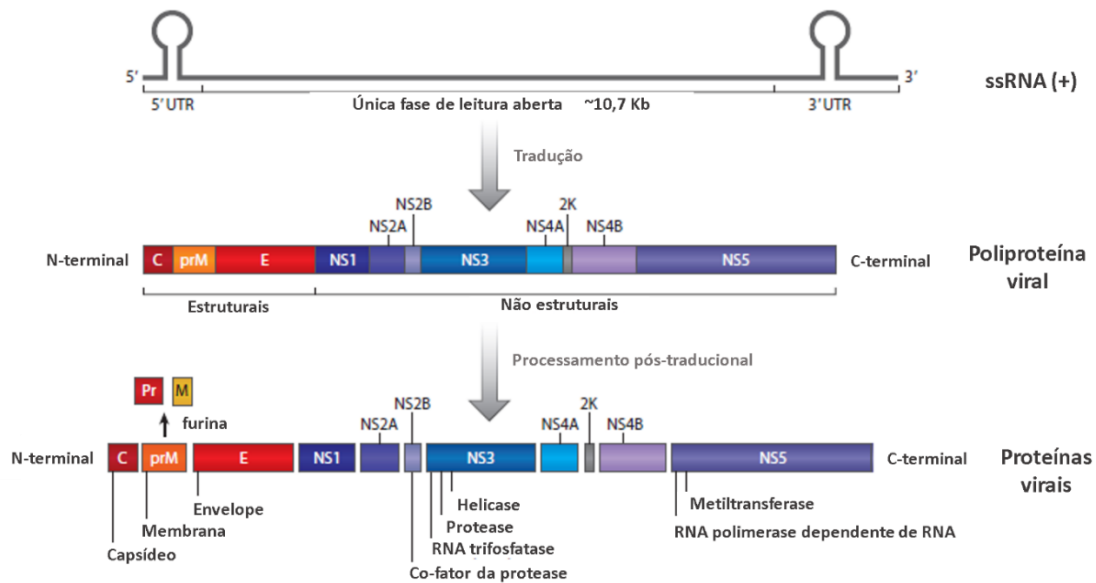


Figura 1.3: Esquemas da organização do genoma infeccioso do DENV e da poliproteína precursora das proteínas virais. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA (ssRNA) com polaridade positiva. O genoma do DENV possui apenas uma única fase de leitura aberta e sua tradução é direcionada para o RE, gerando uma poliproteína precursora. Ao longo da sequência da poliproteína existem sítios de clivagens onde proteases celular e viral atuam, gerando três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (Adaptada de Ngono & Shresta, 2018)

1.4.2. Ciclo de replicação

A infecção inicia-se com a picada do mosquito e liberação dos vírus junto com a saliva do vetor. Primeiramente, o vírus infecta células dendríticas, monócitos e macrófagos, e posteriormente vários outros tipos celulares como hepatócitos, células neuronais e epiteliais (Mukhopadhyay *et al*, 2005; Clyde *et al*, 2006; Paes *et al*, 2009; Flipse *et al*, 2016). Estudos de casos fatais de humanos mostraram que o vírus também é capaz de infectar células pulmonares e fibras musculares cardíacas (Póvoa *et al*, 2014). A diversidade de células permissivas à infecção sugere que o DENV interage com uma grande variedade de receptores comuns a vários tipos celulares. Alguns destes receptores já foram descritos, como: proteínas de choque térmico 70 e 90 (Hsp 70 e 90), heparan sulfato, DC-SING situado na membrana de células dendríticas imaturas, GRP78/Bip, CD14, proteína 37/67 receptora de laminina de alta afinidade, receptor de mucina e imunoglobulina de células T (TIM), CD300a, dentre outros (Hilgard *et al*, 2000; Tassaneetrithep *et al*, 2003; Jindadamrongwech *et al*, 2004; Thepparit *et al*, 2004; Reyes *et al*, 2005; Clyde *et al*, 2006; Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010; Gao *et al*, 2010; Murrell *et al*, 2011; Che *et al*, 2013; Carnec *et al*, 2015; Piccini *et al*, 2015).

A partícula viral interage com receptores localizados na superfície da membrana plasmática das células alvo através da proteína ligante E (Idris *et al*, 2016; Oliveira *et al*, 2017). Tal interação promove a adsorção e entrada da partícula viral por endocitose. O pH ácido do endossoma leva a mudanças conformacionais da proteína E, do estado de dímero para trímero, que expõe o peptídeo de fusão responsável pela fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, culminando na liberação e dissociação do capsídeo viral e consequente liberação do genoma viral no citoplasma celular (Modis *et al*, 2004, 2005; Nayak *et al*, 2009; Freire *et al*, 2015). Além da interação da proteína E com receptores presentes nas células hospedeiras, aparentemente o vírus da dengue também pode ser opsonizado por anticorpos, gerados em uma infecção prévia com um sorotipo diferente, e internalizado através de receptores Fc presentes na superfície de algumas células como dendríticas e macrófagos, em um processo denominado aumento da replicação viral dependente de anticorpos (ADE, do inglês *antibody dependence enhancement*) (Halstead, 2007).

Em seguida, o genoma é traduzido em uma única poliproteína que é clivada por proteases celulares e pela protease viral NS3 associada à NS2B, gerando as proteínas virais estruturais e não estruturais. O RNA viral também serve como fita molde para a transcrição de fitas de RNA de polaridade negativa que, posteriormente, são utilizadas como moldes para a polimerização de novas fitas de RNA de polaridade positiva (Figura 1.4) (Clyde *et al*, 2006; Qi *et al*, 2008). A montagem da partícula viral ocorre no retículo endoplasmático. A clivagem da proteína prM ocorre no complexo golgiense, levando a formação de partículas maduras que são exocitadas pela célula (Clyde *et al*, 2006; Stiasny & Heinz, 2012; Oliveira *et al*, 2017).

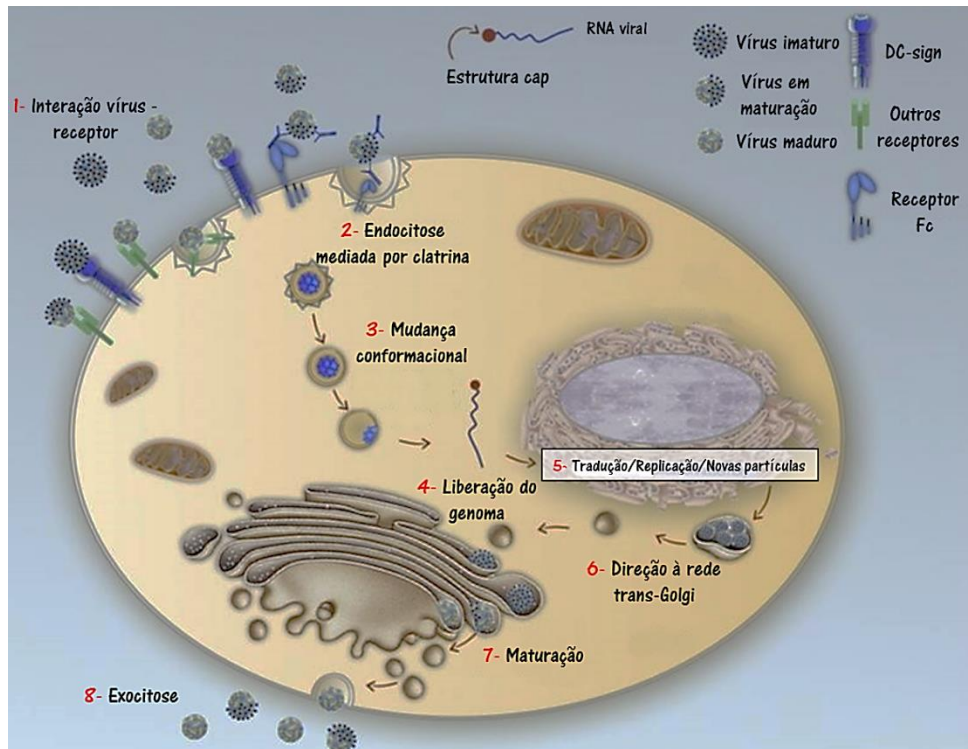


Figura 1.4: Esquema representativo do ciclo de replicação do DENV. Ciclo replicativo: (1) O DENV interage diretamente com receptores presentes na superfície da célula alvo ou indiretamente com os receptores Fc γ quando complexado com anticorpos em concentrações sub- ou não-neutralizantes oriundos de infecções anteriores. (2) A partícula é internalizada em uma vesícula (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) Os processos 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 golgiense, a furina cliva a proteína prM em M, originando partículas maduras ou parcialmente maduras (8) as quais são exocitadas, podendo infectar outras células (Modificado de Green *et al*, 2014).

1.5. Proteínas virais

A proteína E é o maior componente glicoproteico da superfície viral e se destaca pelo seu papel de proteína ligante (Lindenbach & Rice, 2007). Como esta proteína é um dos objetos de estudo deste trabalho, suas características serão mais detalhadas no item 1.5.1.

A proteína C é proteína altamente básica de aproximadamente 12 kDa, que se associa ao RNA viral e a membrana lipídica para formar o nucleocapsídeo. (Lindenbach & Rice, 2007; Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010; Byk & Gamarnik, 2016). Sua região interna contém resíduos hidrofóbicos que interagem com membranas celulares, sendo atribuído a esta proteína um papel na montagem da partícula viral. O processo de encapsidação do genoma não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que requer a participação de proteínas não estruturais além da proteína do capsídeo para aquisição de

membranas e recrutamento tanto do genoma viral como das proteínas estruturais E e prM (Iglesias *et al*, 2015).

A prM é uma glicoproteína precursora da proteína M, e possui peso molecular de aproximadamente 26 kDa. Sua principal função é atuar como chaperonina, impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais drásticas durante a maturação do vírus. Durante a trajetória exocítica, pelo complexo golgiense, a porção N-terminal da proteína prM é clivada pela protease celular furina, resultando na liberação do peptídeo pr e na proteína M (7-9 kDa) que está presente na partícula viral madura. O segmento pr permanece associado à partícula viral até que este seja liberado da célula infectada (Lindenbach & Rice, 2007; Li *et al*, 2008; 2010; Zheng *et al*, 2014).

A proteína NS1 pode ser encontrada no interior de células infectadas, associada à superfície destas células ou ainda ser secretada em grandes quantidades para o meio extracelular, sendo detectada no soro de indivíduos infectados durante a fase aguda da doença (Young *et al*, 2000; Rastogi *et al*, 2016). Sendo assim, várias abordagens laboratoriais utilizam esta proteína como marcador diagnóstico de flaviviruses (Galanew & Hunsperger, 2018). Assim como a proteína E, a proteína NS1 é alvo do presente trabalho e será explorada com mais detalhes no item 1.5.2.

A proteína NS2A, de aproximadamente 22 kDa, é necessária para replicação e montagem dos novos vírions uma vez que faz parte do complexo replicativo. Já se sabe que esta proteína é essencial para processamento correto da proteína NS1 além de estar envolvida na inibição da via de interferon (IFN) mediada pelas proteínas NS4A e B. Já a NS2B, de aproximadamente 14 kDa, está envolvida na função protease do complexo NS2B-NS3 responsável por clivar a poliproteína viral. (Munos-Jordan *et al*, 2003; Niyomrattanakit *et al*, 2004; Natarajan, 2010; Xie *et al*, 2013; Fajardo-Sanchez *et al*, 2017).

A NS3 é uma proteína multifuncional de aproximadamente 70 kDa. Esta proteína apresenta regiões com atividades enzimáticas fundamentais para a replicação do DENV. A sua região N-terminal possui um domínio serino protease dependente da NS2B necessário para o processamento da poliproteína precursora das proteínas virais. Além disso, sua porção C-terminal possui atividade de helicase, RNA trifosfatase e nucleotídeo trifosfatase, importantes no processo de replicação do RNA viral (Lindenbach & Rice, 2007; Qi *et al*, 2008; Swarbrick *et al*, 2017).

A função das proteínas NS4A e NS4B ainda não foi bem elucidada. A proteína NS4A tem 16 kDa e está envolvida no rearranjo de membranas intracelulares que é essencial para replicação viral. Além disso, já foi mostrado que esta proteína é capaz de induzir autofagia, propiciando um aumento da infecção. (Miller *et al*, 2007; McLean *et al*, 2011) Por outro lado, a NS4B, de 27 kDa, é capaz de modular a replicação viral por sua interação com o domínio helicase da proteína NS3. Alguns estudos sugerem que ambas as proteínas têm capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro inibindo as vias de sinalização de IFN α/β . (Munoz-Jordan *et al*, 2003, 2005; Umareddy *et al*, 2006; McLean *et al*, 2011).

A proteína NS5 é a maior proteína não estrutural codificada pelo genoma do DENV e tem aproximadamente 103 kDa. Altamente conservada, esta proteína contém dois principais domínios funcionais: a porção N-terminal possui um domínio metiltransferase responsável pelo capeamento e metilação da extremidade 5' do RNA viral; já a sua região C-terminal atua como RNA polimerase RNA dependente, responsável por sintetizar novas fitas de RNA de polaridade negativa as quais, posteriormente, servem de molde para a síntese de fitas positivas. A NS5 também se apresenta como antagonista das vias de sinalização de IFN α/β (Qi *et al*, 2008; Natarajan, 2010; Potisopon *et al*, 2014; Lubick *et al*, 2015).

1.5.1. Proteína E

A glicoproteína E tem peso molecular de cerca de 53 kDa e é uma das proteínas virais mais bem estudadas. Esta proteína atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície de células alvo e mediando a endocitose da partícula viral, sendo, portanto, o principal alvo antigênico de anticorpos com atividade neutralizante (AcN). Ela também é responsável pela fusão do envelope do vírus à membrana do endossomo e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Pierson & Diamond, 2012; Piccini *et al*, 2015).

A proteína E se dispõe na superfície viral na forma de dímeros. Cada monômero é formado por um domínio transmembrana altamente hidrofóbico (regiões de haste a âncora) na porção C-terminal e um ectodomínio composto pelos domínios I, II e III que representam 80% da proteína (Figura 1.5) (Zhang *et al*, 2003). O domínio I (DI) se dispõe centralmente na proteína e contém vários sítios antigênicos. O domínio II (DII) é

responsável pelo processo de dimerização da proteína E. Além disso, este domínio possui o peptídeo de fusão, exposto mediante acidificação do citoplasma. Os domínios I e II se dispõem fragmentados na estrutura primária da proteína E e assumem uma conformação em dois domínios na estrutura terciária. O domínio III (DIII), localizado na porção C-terminal da proteína é responsável pela interação vírus/célula, uma vez que apresenta epítomos responsáveis pelo reconhecimento e ligação aos receptores presentes na superfície das células hospedeiras. Já foram descritos epítomos alvos de AcN situados nos três domínios da proteína E. Alguns destes AcN reconhecem cruzadamente diferentes sorotipos de DENV além de outros flavivirus. (Lee *et al*, 1997; Roerig *et al*, 1998; Modis *et al*, 2003, 2004; Guzman *et al*, 2010; Wahala *et al*, 2012; Cockburn *et al*, 2012; Fibriansah *et al*, 2014, 2015; Campos *et al*, 2017).

Devido ao seu potencial imunogênico, esta proteína tem sido considerada um dos principais alvos no desenvolvimento de vacinas contra dengue (Rey *et al*, 2018).

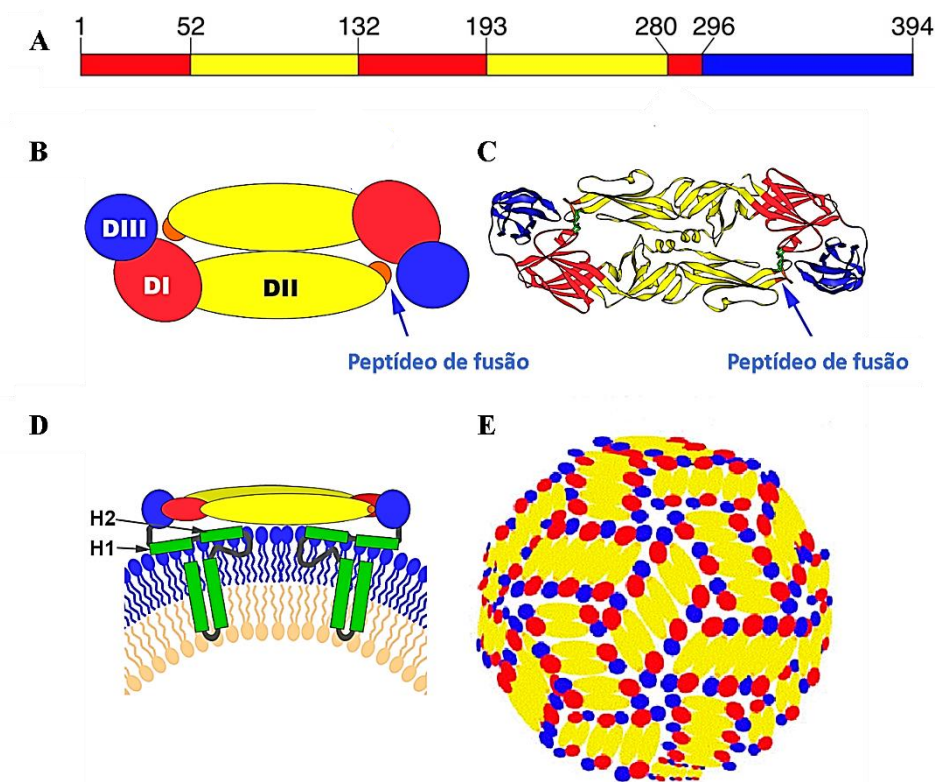


Figura 1.5: Representação da proteína E e seus domínios. (A) Esquema dos aminoácidos que compõem o ectodomínio da proteína E. Estão representados os domínios I (vermelho), II (amarelo) e III (azul) e o peptídeo de fusão (laranja). (B-C) Organização dos dímeros do ectodomínio da proteína E. (D) Configuração do ectodomínio e representação das regiões haste/âncora (verde) em relação à bicamada lipídica. (E) Conformação diméridica da proteína E presente na superfície das partículas virais maduras (Adaptada de Stiasny & Heinz, 2006)

1.5.2. A proteína NS1

A glicoproteína NS1 possui aproximadamente 43-48 kDa e é expressa nas células infectadas sob a forma de monômeros solúveis os quais se dimerizam no lúmen do retículo endoplasmático. Subsequentemente, esta proteína dimérica é transportada pela via de secreção para a superfície celular onde pode permanecer associada à membrana plasmática via âncora GPI (Glicosil-Fosfatidil-Inositol) ou ser secretada para o meio extracelular na forma de hexâmeros solúveis (Falgout *et al*, 1989; Young *et al*, 2000; Amorim *et al*, 2014). Estruturalmente, os monômeros da proteína NS1 possuem três domínios: β -roll, β -leader e *wing*. Por sua vez, a forma hexamérica possui a forma de barril aberto que engloba uma variedade de lipídeos (Figura 1.6) (Muller *et al*, 2012; Muller & Young, 2013).

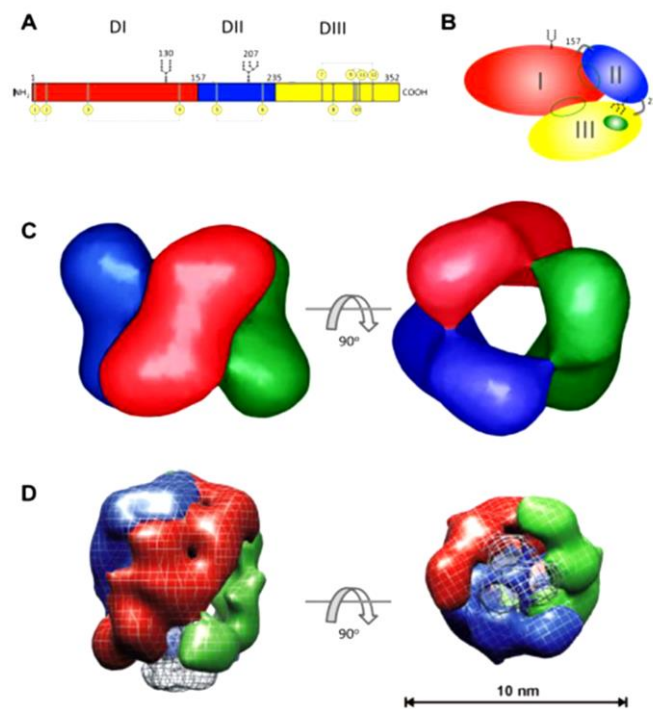


Figura 1.6: Modelo 3D da proteína NS1. (A) Representação esquemática da proteína NS1 linear e seus domínios I (vermelho), II (azul) e III (amarelo). Círculos amarelos representam as cisteínas e os dois sítios de glicosilação (130 e 207) estão representados em preto; (B) Representação da estrutura terciária do monômero; (C) Reconstrução 3D realizada por microscopia crioelétrica da proteína na sua forma hexamérica: as estruturas em verde, vermelho e azul representam os dímeros. (D) A mesma reconstrução 3D, no qual é possível observar onde ficariam os lipídeos (porção transparente) englobados pelo hexâmero (Modificado de Muller & Young, 2013)

Embora o papel da proteína NS1 ainda não esteja bem elucidado, vários trabalhos propuseram seu envolvimento na patogênese, associando esta proteína ao desenvolvimento das formas mais graves da doença (Libraty *et al*, 2002; Lin *et al*, 2002; Avirutnan *et al*, 2006; Lin *et al*, 2012; Amorim *et al*, 2014;). Em contraposição,

outros trabalhos ressaltam que a proteína NS1 assim como anticorpos gerados contra esta proteína são promissores objetos de estudo para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus Dengue. Dentre estes trabalhos, nosso grupo mostrou que vacinas de DNA baseadas na NS1 induzem proteção contra o sorotipo 2 do vírus Dengue (Schlesinger *et al*, 1987, 1993; Henschal *et al*, 1988; Wu *et al*, 2003; Costa *et al*, 2006; Costa *et al*, 2007; Amorim *et al*, 2012; Huang *et al*, 2013; Wan *et al*; 2014, 2017; Gonçalves *et al*, 2015; Lai *et al*, 2017; Hertz *et al*, 2017).

1.6. Resposta imune

Evidências sólidas indicam que interferons do tipo I (IFN α/β) são mediadores importantes na resposta imune protetora contra infecções virais em geral, incluindo DENV (Ngono & Shresta, 2018). Durante os estágios iniciais da infecção, componentes virais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (PPR, do inglês *pattern recognition receptors*), resultando na ativação de vários fatores transcricionais envolvidos na produção de IFN e outras citocinas inflamatórias. O principal mecanismo viral de evasão da resposta imune inata do hospedeiro se dá através da inibição da via de IFN (Costa *et al*, 2013). Proteínas não estruturais de DENV, como a NS2A, NS2B3, NS4A e NS4B, assim como moléculas de RNA não codificantes já se mostraram capazes de atenuar a produção de IFN na célula infectada por vários mecanismos (Gack & Diamond, 2016).

A infecção primária com um dos quatro sorotipos do DENV geralmente é subclínica e induz imunidade duradoura contra infecções secundárias com sorotipo homotípico. Entretanto, a resposta imune protetora cruzada entre sorotipos heterólogos é de curta duração, contribuindo para ocorrência de epidemias sequenciais com diferentes sorotipos virais. (Murphy & Whitehead, 2011; Montoya *et al*, 2013). Dados epidemiológicos mostram que o desenvolvimento das formas mais graves da doença ocorre com maior frequência em infecções secundárias com sorotipo heterólogo, sugerindo um relevante envolvimento da resposta imune adaptativa do hospedeiro no agravamento da doença (Guzman *et al*, 2013).

A maioria dos anticorpos gerados após a infecção pelo DENV é direcionada contra as proteínas estruturais E e prM/M e contra a NS1 (Kinney & Huang, 2001). A proteína E é alvo majoritário de anticorpos neutralizantes. Tais anticorpos reconhecem epítomos presentes nos três domínios da proteína E e exibem diferentes graus de

neutralização e reatividade cruzada entre os quatro sorotipos de DENV (Campos *et al*, 2017). Tradicionalmente, trabalhos em modelo murino mostraram que o DIII da proteína E contém a maioria dos epítomos reconhecidos por anticorpos homotípicos com alto potencial neutralizante, sendo considerado principal indutor desta resposta (Sukupolvi-Petty *et al*, 2007; Shresta *et al*, 2010; Coconi-Linares *et al*, 2013; Poggianela *et al*, 2015). Por sua vez, anticorpos direcionados aos DI e II seriam pouco neutralizantes, apresentando reação cruzada com outros sorotipos. Contudo, estudos mais recentes com soro de pacientes infectados pelo vírus da dengue demonstram um baixo nível de anticorpos neutralizantes contra o DIII. Tais estudos sugerem que este domínio desempenha um papel minoritário na neutralização viral e ressaltam a importância de epítomos contidos nas outras regiões da proteína E para a indução da resposta imune humoral protetora (Wahala *et al*, 2009; de Alwis *et al*, 2012; Lin *et al*, 2012; Widman & Baric, 2015).

A resposta de anticorpos direcionada à proteína NS1 ainda é controversa (Rastogi *et al*, 2016). A proteína NS1 compartilha epítomos comuns a proteínas do hospedeiro, principalmente presentes em células endoteliais e plaquetas. Desta forma, anticorpos anti-NS1 poderiam apresentar reação cruzada contra estes epítomos, culminando em um processo autoimune (Falconar, 1997, 2007; Rastogi *et al*, 2016; Beatty *et al*, 2016; Puerta-Guardo *et al*, 2016). Um dos eventos autoimunes mais importantes é a ligação de anticorpos anti-NS1 às plaquetas e proteínas da cascata de coagulação como protrombina e trombina, inibindo a agregação plaquetária e a coagulação (Cheng *et al*, 2009; Lin *et al*, 2012; Wan *et al*, 2013). Além disso, já foi observado que a proteína NS1 é capaz de ativar a cascata do sistema complemento, formando imunocomplexos que podem estar envolvidos na patogênese dos quadros graves da doença (Avirutnan *et al*, 2006, 2011). Entretanto, a maioria dos estudos de associação de anticorpos anti-NS1 e patogênese utilizou anticorpos gerados contra a proteína NS1 desnaturada expressa em *E. coli* e, portanto, reconhecem epítomos lineares desta proteína. Em contraste, a resposta imune humoral desencadeada por essa proteína já foi associada a mecanismos protetores. Alguns estudos sugerem que a proteção induzida pela NS1 seria mediada pela produção de anticorpos com atividade de fixação de complemento, que levariam à lise das células infectadas com vírus, por possuírem NS1 associada à sua membrana (Lin *et al*, 1998; Miller, 2010).

Embora anticorpos desempenhem um papel fundamental na indução de uma resposta imune humoral protetora contra o DENV, anticorpos preexistentes oriundos de uma infecção primária podem representar um fator de risco de agravamento da doença. Dados epidemiológicos sustentados por ensaios experimentais sugerem que tais anticorpos teriam participação no desenvolvimento de quadros graves da doença, uma vez que os anticorpos heterólogos podem se ligar a um sorotipo diferente, facilitando a entrada do DENV nas células alvos via receptores para $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$) em sua superfície, como células dendríticas e macrófagos (Guzman *et al*, 2013; Katzeknick *et al*, 2017; Rey *et al*, 2018). Tal fenômeno é conhecido como “aumento da infecção dependente de anticorpos” (ADE, do inglês: *antibody-dependent enhancement*) (Halstead, 2003) (Figura 1.7). O ADE pode ocorrer devido à uma baixa concentração de anticorpos (número inferior ao limite de anticorpos necessário para que ocorra a neutralização) ou pela baixa avidéz de anticorpos preexistentes.

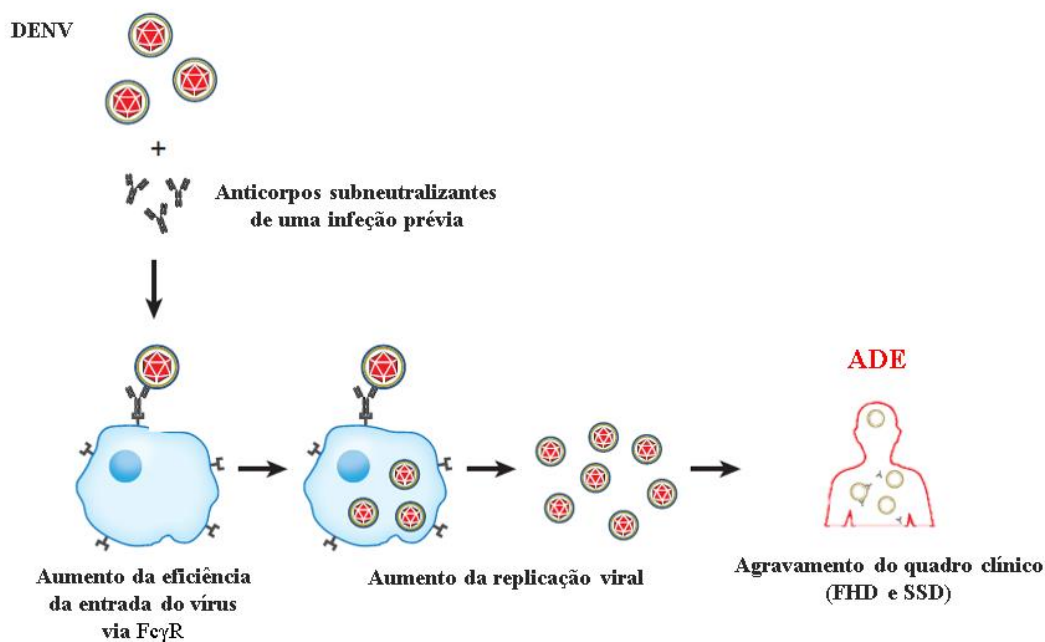


Figura 1.7: Representação esquemática do mecanismo de ADE. Em uma infecção secundária anticorpos heterotípicos não neutralizantes (gerados em infecção prévia) se ligam às partículas de DENV. Células que possuem receptores $Fc\gamma R$ podem se ligar a porção Fc do complexo formado do vírus com anticorpos, facilitando a entrada da partícula viral na célula (Adaptada de Ngoni & Shresta, 2018)

A infecção pelo vírus da dengue também induz uma resposta imune celular específica e de memória, com participação de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ (Roth *et al*, 2018). Alguns estudos sugerem que as células $TCD8^+$ reconhecem majoritariamente epítomos imunogênicos presentes nas proteínas não estruturais NS3, NS4B e NS5,

enquanto que as células TCD4⁺ respondem principalmente a epítomos das proteínas estruturais C e E (Ngono & Shresta, 2018; Roth *et al*, 2018). Em geral, as respostas de células T contra DENV envolvem um conjunto diversificado de funções efetoras que contribuem para proteção, tais como proliferação, lise de células alvos e a produção de várias citocinas e quimiocinas. Entretanto, a Teoria do Pecado Original (do inglês, *original antigenic sin*) (Mongkolsapaya *et al*, 2003; Rothman *et al*, 2011) se baseia na reatividade cruzada de linfócitos de memória gerados em infecção prévia com DENV para explicar o agravamento dos casos de dengue em infecções secundárias. Neste caso, linfócitos T de memória, oriundo de uma infecção prévia com um sorotipo, seriam preferencialmente ativados em uma infecção secundária com outro sorotipo em detrimento do desenvolvimento de uma resposta específica ao sorotipo infectante. Por conseguinte, estas células com baixa afinidade a epítomos do sorotipo da infecção secundária contribuiriam para uma resposta imune não protetora caracterizada por aumento exacerbado de citocinas inflamatórias.

Em relação à proteção, alguns trabalhos em modelo murino têm mostrado a importância da resposta de células T à infecção pelo DENV, principalmente através da ativação de células TCD8⁺ e seu papel efetor. Contudo, nosso grupo também demonstrou o papel da resposta imune celular direcionada à NS1 na proteção contra DENV, principalmente envolvendo células CD4⁺. Alguns epítomos imunogênicos identificados em camundongos também foram reconhecidos por células T de indivíduos infectados pelo DENV (Yauch *et al*, 2010; Zompi *et al*, 2012; Gonçalves *et al*, 2015; Zellweger *et al*, 2015; Oliveira *et al*, 2016; Ngono *et al*, 2016).

1.7. Vacinas contra dengue em fase pré-clínicas e clínicas

A pesquisa e desenvolvimento de uma vacina contra dengue enfrenta grandes desafios. Uma das principais dificuldades consiste na existência de quatro sorotipos antigenicamente distintos. Portanto, uma vacina segura contra DENV deve ser capaz de conferir uma resposta imune protetora contra os quatro sorotipos virais de maneira simultânea, equilibrada e duradoura, evitando o desencadeamento dos quadros mais graves da doença associados a infecções secundárias com sorotipo heterólogo (Bäck *et al*, 2013; Fahimi *et al*, 2018). Outro problema a ser contornado é a falta de um modelo experimental capaz de simular os aspectos patológicos e clínicos observados nos seres humanos. Os modelos murinos são os mais utilizados para avaliar a imunogenicidade de

novas vacinas candidatas (Wan *et al*, 2013). Como camundongos não são naturalmente infectados pelo DENV, esforços têm sido canalizados para o desenvolvimento de estratégias que tornem estes animais suscetíveis à infecção e, conseqüentemente, um modelo apropriado para estudos de imunogenicidade e proteção (Woonsung *et al*, 2017). Ademais, a expansão global da dengue implica que a eficácia de uma possível abordagem vacinal seja avaliada em diferentes regiões geográficas com cenários epidemiológicos distintos (Fahimi *et al*, 2018).

As proteínas E e NS1 são indicadas como antígenos promissores para integrarem uma vacina contra DENV. A proteína E é capaz de induzir a produção de anticorpos que podem ser neutralizantes, impedindo a entrada do vírus na célula (Schieffelin *et al*, 2010). A proteína NS1 também induz uma resposta imune humoral (Schlesinger *et al*, 1987; Lin *et al*, 1998).

Dentre as candidatas vacinais em desenvolvimento destacam-se as vacinas de vírus inativado, vírus vivos atenuados e/ou recombinantes (quimeras), vacinas de subunidades e vacinas de DNA (Putnak *et al*, 1996; Blaney *et al*, 2006; Costa *et al*, 2007; Suzuki *et al*, 2009; Azevedo *et al*, 2011; Wei *et al*, 2014; Schwartz *et al*, 2015; Chen *et al*, 2016; Hurtado-Melgoza *et al*, 2016; Versiani *et al*, 2017; Zheng *et al*, 2017; Fahimi *et al*, 2018).

Em 2015, a primeira vacina contra dengue, Dengvaxia (CYD-TDV), desenvolvida pela Sanofi Pasteur, foi licenciada no México e nas Filipinas. Esta vacina consiste em uma formulação tetravalente composta por vírus quiméricos atenuados contendo os genes prM/E dos quatro sorotipos virais de dengue inseridos em um “esqueleto” do vírus vacinal da febre amarela (YFV-17D) (Guy *et al*, 2010). Desde então, a vacina foi introduzida em 14 países endêmicos, incluindo o Brasil. A OMS recomenda a imunização com 3 doses da vacina que devem ser administradas com intervalo mínimo de 6 meses em indivíduos entre 9 e 45 anos de idade (WHO, 2016). Contudo, a segurança desta vacina tem sido objeto de preocupação da comunidade científica (Aguiar *et al*, 2016; Martinez-Vega *et al*, 2017; Halstead, 2017). A eficácia protetora desta vacina foi avaliada em ensaios clínicos de fase IIb e III com mais de 35 mil crianças e adolescentes em 10 países endêmicos da Ásia (CYD14) (Capeding *et al*, 2014) e da América Latina (CYD15) (Villar *et al*, 2015). O acompanhamento a longo prazo destes estudos revelou uma proteção global de aproximadamente 60%. Entretanto, a taxa de proteção foi menor em indivíduos soronegativos (37%) em comparação ao

grupo de pessoas já infectadas pelo DENV (79%). Além disso, foi observado um maior risco de hospitalização por dengue em crianças imunizadas com a vacina CYD-TDV em comparação aos indivíduos mais velhos (Hadinagoro *et al*, 2015; Schwartz *et al*, 2015). Desde então, grupos têm ressaltado a relevância do acompanhamento do *status* sorológico dos indivíduos vacinados com CYD-TDV, sugerindo um possível efeito de “enhancement” da doença em indivíduos soronegativos imunizados pela vacina que posteriormente se infectaram com o vírus. A incidência de infecções prévias pelo DENV é menor no grupo de indivíduos mais jovens, uma vez que estes foram expostos ao vírus por menor tempo. Trabalhos sugerem que a baixa soroprevalência de dengue nestes indivíduos, e não a idade, seria o fator determinante para aumento de risco de agravamento da doença após vacinação com CYD-TDV. (Halstead, 2016; Alguiar *et al*, 2016; Dans *et al*, 2018). Em 2017, tendo em vista o risco de manifestação das formas graves da doença, a ANVISA passou a recomendar que pessoas soronegativas não sejam vacinadas no Brasil com a vacina Dengvaxia (ANVISA, 2017).

Outra vacina quimérica tetravalente, DENVax ou TDV, foi desenvolvida pelo CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) e posteriormente licenciada pela Inviragen nos EUA. Esta estratégia é composta pelo “esqueleto” de DENV2 atenuado por passagem em células de mamífero no qual foram substituídos os genes prM/E referentes aos demais sorotipos virais (Osorio *et al*, 2011). Nos ensaios pré-clínicos, a vacina tetravalente revelou ser altamente segura e imunogênica, induzindo a produção de AcN assim como ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (Osorio *et al*, 2011; Fuchs *et al*, 2014). Na Colômbia e nos Estados Unidos, ensaios clínicos de fase I com adultos saudáveis vacinados com altas ou baixas doses da vacina confirmaram a imunogenicidade das formulações tetravalentes DENVax. Os indivíduos imunizados com alta dose da vacina por via intradérmica apresentaram altos níveis de soroconversão (75-100%) com produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos virais (Osorio *et al*, 2014; George *et al*, 2015). Esta estratégia foi testada em ensaios clínicos de fase II em quatro países da Ásia e da América Latina com indivíduos de 2 a 45 anos de idade. Após duas doses da formulação tetravalente DENVax, mais de 97% dos indivíduos apresentaram soroconversão (Sirivichayakul *et al*, 2016).

Outra vacina viva atenuada foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH, *National Institute for Health*) e está sendo produzida pelo Instituto Butantan no Brasil para ensaios clínicos. Nesta vacina, o vírus foi atenuado por deleções de 30

nucleotídeos ($\Delta 30$) na região não traduzida 3'-UTR para cada sorotipo do DENV (Durbin *et al*, 2011). Nos ensaios clínicos de fase I, a administração de uma dose única da formulação tetravalente, induziu resposta de anticorpos para os sorotipos 1, 3 e 4 (85-100%) e, em menor magnitude para o sorotipo 2 (50%). A fim de corrigir a baixa imunogenicidade para DENV2, uma nova formulação tetravalente (TV005) com maior dose do vírus quimérico para este sorotipo foi avaliada em ensaio clínico nos Estados Unidos. Indivíduos soronegativos para dengue vacinados com uma dose única desta nova abordagem apresentaram uma resposta imune humoral mais balanceada, com soroconversão global variando entre 92 e 100% (Durbin *et al*, 2013; Kirkpatrick *et al*, 2015; Schwartz *et al*, 2015). Em 2016, O Instituto Butantan iniciou estudo clínico de fase III envolvendo cerca de 17 mil adultos saudáveis no Brasil.

Apesar dos estudos avançados de vacinas atenuadas, é importante ressaltar que reversões ou recombinações gênicas podem ocorrer, representando um risco de desenvolver a doença. Sendo assim, alguns grupos vêm avaliando a produção de vacinas baseadas em subunidades proteicas ou vírus inativado.

Uma abordagem vacinal (DEN-80Es) desenvolvida pela Hawaii Biotech e posteriormente pela Merck, consiste na combinação de subunidades proteicas recombinantes contendo a proteína prM e o ectodomínio da proteína E dos quatro sorotipos virais expressas em cultura de células de *Drosophila melanogaster*. Uma formulação tetravalente avaliada em camundongos e macacos mostrou que estas proteínas recombinantes induzem soroconversão contra os quatro sorotipos de dengue, além de gerar proteção contra o desafio viral (Coller *et al*, 2011). Atualmente, os ensaios clínicos para esta abordagem ainda se encontram em fase I com formulações monovalentes com doses baixas, intermediárias e altas. Um pequeno estudo clínico com indivíduos adultos soronegativos para DENV vacinados com alta dose proteína recombinante do sorotipo 1 (DEN1-80E) resultou em aproximadamente 83% de soroconversão. Entretanto, há uma queda drástica da resposta de anticorpos pouco tempo após imunização (Manoff *et al*, 2015).

A GSK (do inglês, *GlaxoSmithKline*) em parceria com o WRAIR desenvolveu formulações tetravalentes (DPIV) de vacinas de vírus inativado, cuja formulação monovalente se mostrou protetora e imunogênica em camundongos e macacos Rhesus (Beaumier *et al*, 2013; Fernandez *et al*, 2015). Ensaios clínicos de fase I nos Estados Unidos e Porto Rico foram realizados com diferentes formulações tetravalentes

administradas com vários adjuvantes. A vacina se mostrou imunogênica, induzindo resposta balanceada de anticorpos com atividade neutralizante contra os quatro sorotipos virais. Entretanto, os ensaios clínicos foram realizados com um número pequeno de indivíduos (Schmidt *et al*, 2017; Diaz *et al*, 2018). Esta vacina deveria ser testada no Brasil em ensaios clínicos, mas dados mais recentes revelaram baixa imunogenicidade e o seu teste foi suspenso no país.

1.8. Vacinas de DNA

Vacinas de DNA vêm sendo utilizadas experimentalmente para indução de imunidade contra diferentes patógenos, tumores, alergias e doenças autoimunes (Pereira *et al*, 2014). Esta tecnologia consiste na utilização de um ou mais plasmídeos de expressão em células eucarióticas contendo genes que codificam proteínas imunogênicas. Após a “entrega” (*delivery*) ao hospedeiro, o vetor plasmideal contendo o gene de interesse é internalizado para o meio intracelular, onde o gene pode ser expresso *in vivo* e a proteína é posteriormente reconhecida pelo sistema imunológico.

Os antígenos sintetizados pela célula do hospedeiro vacinado podem ser processados e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), via o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e/ou II, sendo capazes de gerar respostas imunes específicas e duradouras (Figura 1.8) (Whitehead, 2007; Kahn, 2013). Sendo assim, uma das grandes vantagens das vacinas de DNA é a sua capacidade de induzir tanto imunidade humoral quanto celular, mimetizando o que ocorre durante a infecção natural (Liu, 2011; Meunier *et al*, 2015). Somado a isso, a produção endógena do antígeno possibilita que a proteína recombinante possua uma conformação semelhante à apresentada durante a infecção natural, dependendo do desenho do plasmídeo recombinante (Srivastava & Liu, 2003). Vacinas de DNA também ativam a resposta imune inata do hospedeiro, o que incorpora a esta abordagem vacinal um efeito adjuvante. O DNA bacteriano exógeno contém regiões ricas em motivos CpG não metiladas que são reconhecidas pelas células do hospedeiro como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) (Willians, 2013).

Vacinas de DNA apresentam maior segurança em relação às vacinas clássicas de vírus atenuado, uma vez que não estão sob o risco de reversão da virulência. Sendo

assim, a cobertura vacinal abrangida por vacinas de DNA abarcaria o grupo de indivíduos imunocomprometidos, que muitas vezes são impossibilitados de se vacinarem com formulações baseadas em vírus vivos atenuados devido aos riscos destas vacinas. Além disso, outras vantagens das vacinas de DNA são o baixo custo de produção e maior estabilidade a variações na temperatura, fatores que facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de campanhas de vacinação em regiões de difícil acesso (Kahn, 2013).

Entretanto, as vacinas de DNA se mostraram pouco imunogênicas em estudos com primatas não-humanos e humanos. Uma das principais dificuldades que o desenvolvimento de vacinas de DNA enfrenta é a baixa eficiência de transfecção de células hospedeiras em humanos. Sendo assim, várias estratégias físicas de “entrega” (*delivery*) têm sido desenvolvidas para melhor internalização e transporte do DNA plasmídeo nas células do hospedeiro, como por exemplo, a imunização por eletroporação e biobalística. Além disso, sequências que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras podem ser incorporadas ou administradas concomitantemente aos plasmídeos recombinantes para potencializar a resposta imune (Wahren & Liu, 2014).

Uma abordagem promissora é a utilização de vacinas de DNA para complementar ou aumentar a eficácia protetora de vacinas tradicionais. A combinação de vacinas de DNA com outras vacinas em sistemas de dose e reforço (*prime-boost*) também são capazes de induzir respostas imunes mais eficientes (Saade & Petrovsky, 2012; Li *et al*, 2012).

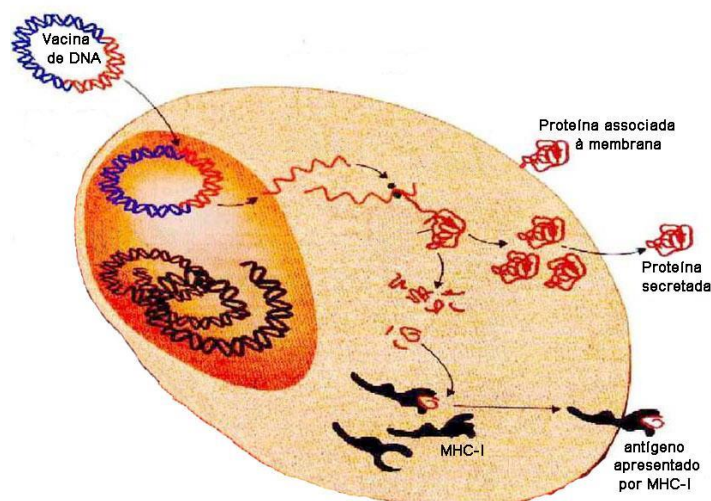


Figura 1.8: Representação esquemática da expressão e apresentação de proteínas recombinantes através de vacinas de DNA: O plasmídeo recombinante contendo o fragmento de DNA de interesse é injetado no indivíduo. Células transfectadas deste indivíduo passam a expressar a proteína recombinante, que pode ser direcionada para diferentes compartimentos celulares (expressão citoplasmática, associação à membrana plasmática e/ou secreção para o meio extracelular) e ser apresentada por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), podendo gerar respostas imunológicas protetoras (Modificada de Weiner & Kenned, 1999).

1.8.1. Vacinas de DNA contra dengue

Vários grupos têm avaliado o uso da vacina de DNA no controle da infecção pelo vírus Dengue. Estes estudos demonstraram a indução de resposta imune protetora em camundongos, primatas não-humanos e humanos após imunização. Algumas destas vacinas são baseadas nas proteínas estruturais, C, prM e E, enquanto outras tem como alvo as proteínas não estruturais NS1 e NS3 (Kochel *et al*, 1997; Porter *et al*, 1998; Kochel *et al*, 2000; Wu *et al*, 2003; Raviprakash *et al*, 2006; Mota *et al*, 2005; Simmons *et al*, 2006; Costa *et al*, 2007; Mellado-Sánchez *et al*, 2010; Beckett *et al*, 2011; Azevedo *et al*, 2013; Lu *et al*, 2013; McBurney *et al*, 2016; Chen *et al*, 2016; Hurtado-Melgoza *et al*, 2016; Zheng *et al*, 2011; 2017).

O Centro Naval de Pesquisas Médicas (*Naval Medical Research Center*), nos EUA, elaborou a única vacina tetravalente em estágio de fase clínica, contendo plasmídeos que codificam os genes prM/E dos quatro sorotipos do DENV. Nos ensaios clínicos de fase I, foi testada a vacina de DNA monovalente anti-DENV1, entretanto os níveis de anticorpos neutralizantes gerados se mostraram baixos e houve pouca soroconversão (Beckett *et al*, 2011). Contudo, uma formulação tetravalente desta vacina de DNA, a TVDV, administrada em combinação com adjuvante em macacos, resultou

em um aumento da imunogenicidade, com resposta equilibrada de anticorpos neutralizantes e proteção contra desafio com DENV2 (Porter *et al*, 2012). Recentemente, foram publicados os resultados de ensaios clínicos de fase I com indivíduos adultos vacinados com 3 doses da TVDV. Embora a resposta de anticorpos tenha sido baixa e não neutralizante, mesmo no grupo vacinado com altas doses da TVDV, foi observada ativação da resposta celular mediada por células T em cerca de 80% dos indivíduos (Danko *et al*, 2018).

Mais recentemente, diversos estudos foram realizados com vacinas de DNA contra outros flavivírus, como o vírus Zika, utilizando os genes que codificam as proteínas prM e E. Tais vacinas se mostraram protetoras em testes com camundongos e primatas não humanos (Poland *et al*, 2018). Atualmente existem três vacinas de DNA contra Zika sendo testadas em ensaios clínicos de fase I (Makluf & Shresta, 2018).

Nosso grupo vem trabalhando com vacinas contra dengue nos últimos anos, construindo diferentes vacinas de DNA e testando-as em modelos murinos. As construções baseadas nas proteínas E e NS1 de DENV2 se mostraram bastante promissoras quanto à imunogenicidade e proteção em modelo murino. A vacina pE1D2 codifica o ectodomínio (DI/II/II) da proteína E de DENV2, fusionada ao peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) que direciona a proteína recombinante para a secreção para o meio extracelular. A imunização com esta vacina gerou 100% de sobrevivência em camundongos BALB/c frente ao desafio viral. Além de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, esta vacina foi capaz de ativar a resposta imune celular com a produção de IFN γ (Azevedo *et al*, 2011, 2013). Mesmo com recentes avanços, ainda pouco se sabe sobre a colaboração dos diferentes braços da resposta imune contra DENV na proteção.

Nosso grupo também construiu uma vacina de DNA baseada na proteína NS1 de DENV2, denominada pcTPANS1. Esta vacina também foi capaz de induzir respostas imunes protetoras contra DENV2 em camundongos desafiados com o vírus (Costa *et al*, 2006, 2006b, 2007). Em um estudo posterior, envolvendo depleção de células T CD4⁺ ou CD8⁺ nos animais vacinados, transferência passiva de anticorpos anti-NS1 e adotiva de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, o grupo observou que a proteção gerada com a vacina pcTPANS1 está associada à presença de anticorpos anti-NS1 e ativação primordial de células T CD4⁺ (Gonçalves *et al*, 2015).

Diante destes dados, o desenvolvimento de uma vacina de DNA baseada na expressão concomitante de ambas as proteínas poderia constituir uma vacina mais eficaz, impedindo tanto a entrada do vírus na célula hospedeira, mediada por uma resposta contra a proteína E, quanto destruindo células infectadas, com uma resposta direcionada à NS1. Desta forma, foi construída uma vacina de DNA baseada na expressão concomitante de ambas as proteínas, E e NS1 de DENV2, denominada pNS1/E/D2. A imunogenicidade e a proteção geradas com esta nova vacina, assim como com a combinação das vacinas pE1D2 e pcTPANS1, foi avaliada em camundongos BALB/c. Além disso, estudamos mais a fundo a resposta imune humoral e celular gerada pela proteína E, mediada por vacinas de DNA.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação foi avaliar a resposta imune gerada com vacinas de DNA codificando diferentes domínios da proteína E de DENV2 e seu papel na proteção. Além disso, demos continuidade aos estudos com uma vacina de DNA que contém os genes E e NS1 de DENV2, pNS1/E/D2, sob o controle de promotores distintos, investigando a expressão concomitante das proteínas recombinantes e a resposta imune gerada em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade neutralizante do soro de camundongos imunizados com a vacina pE1D2, antes e após a depleção de anticorpos anti-DIII;
- ✓ Mapear os epítomos imunodominantes da proteína E envolvidos na resposta imune celular induzida pela vacina pE1D2, através da produção de IFN- γ em esplenócitos isolados de camundongos imunizados, desafiados ou não com DENV2, mediante estímulo com uma biblioteca de peptídeos sintéticos contidos nesta proteína;
- ✓ Avaliar a imunogenicidade de uma nova vacina de DNA contendo somente a sequência que codifica os domínios I e II (DI/II) da proteína E e proteção em camundongos desafiados com DENV2;
- ✓ Avaliar a expressão concomitante das proteínas E e NS1 *in vitro* em células transfectadas com a vacina pNS1/E/D2, que contém os genes E e NS1 sob o controle de promotores distintos;
- ✓ Avaliar as respostas imunes humoral e celular induzidas com a vacina de DNA pNS1/E/D2 em camundongos e proteção contra DENV2.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Lista de meios e tampões de uso recorrente

Tampão Fosfato de Sódio 0,1M (1L)

→ 77,4mL de Na₂HPO₄ 1M, 22,6mL de NaH₂PO₄ 1M, pH 7.4, água deionizada para completar 1L

Tampão Fosfato-salino PBS (1L)

→ 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄, pH 7.3, água deionizada para completar 1L

Tampão Fosfato-salino PBST (1L)

→ 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄, pH 7.4, 0,05% Tween20 v/v, água deionizada para completar 1L

Meio 199 com Sais de Earle (1L)

→ 9,5g de meio 199 Earle, 2,2g de NaHCO₃, 1% v/v de gentamicina, 2,5 mL de HEPES 1M, pH=7.4, água deionizada para completar 1 L

3.2. Plasmídeos pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2, pcTPA construídos anteriormente

Todos os plasmídeos utilizados são derivados do vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3 (Invitrogen) e estão representados na figura 3.1. Os plasmídeos pE1D2 e pcTPANS1 estão descritos na literatura (Azevedo *et al*, 2011; Costa *et al*, 2006). O plasmídeo pE1D2 contém a sequência que codifica 80% da proteína do envelope (região do ectodomínio: DI, II e III) de DENV2, cepa Nova Guiné (NGC) e o plasmídeo pcTPANS1 contém a sequência que codifica a proteína NS1 inteira de DENV2, cepa NGC. Em ambas as construções, os genes estão fusionados à sequência

que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) e sob controle da região promotora do citomegalovírus humano (CMV).

O plasmídeo recombinante pNS1/E/D2, previamente construído pelo grupo, contém os genes E e NS1 sob o controle de dois promotores distintos. O cassete de expressão da proteína NS1 contém a região promotora do vírus Símio 40 (SV40), a sequência sinal t-PA, o gene NS1 de DENV2 e a sequência de poliadenilação derivada do SV40. Já o cassete de expressão da proteína E contém a sequência do t-PA e a sequência que codifica o ectodomínio (constituído dos domínios I, II e III) da proteína E de DENV2, cuja expressão é regulada pelo promotor do CMV, e a sequência de poliadenilação derivada hormônio de crescimento bovino (BGH).

Como controle negativo foi usado o plasmídeo pcTPA. Este plasmídeo possui apenas a sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) a jusante a região promotora do CMV.

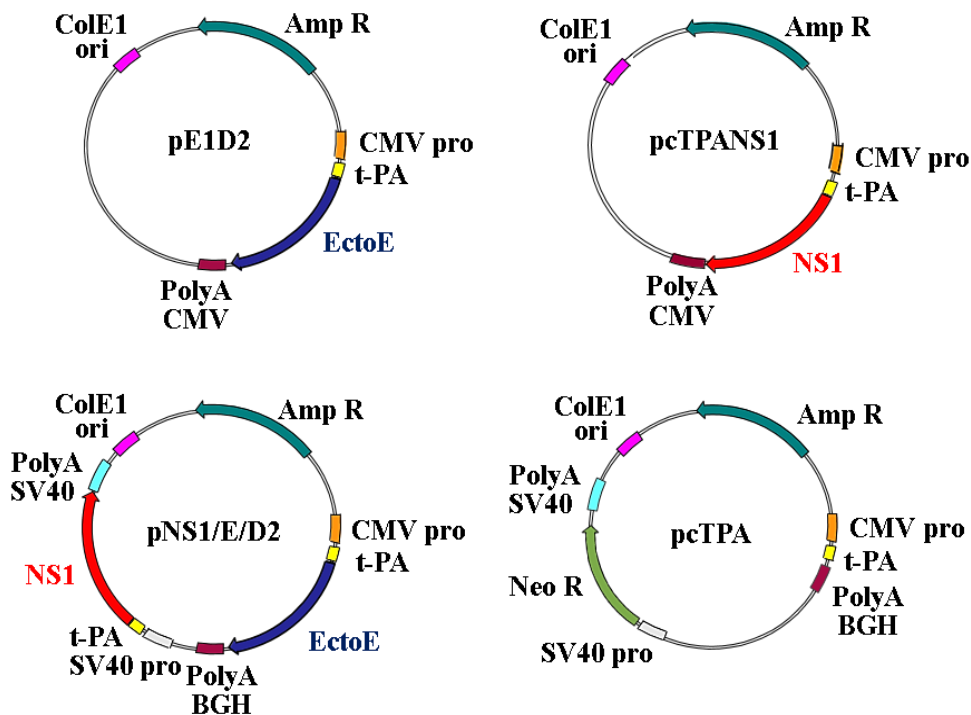


Figura 3.1: Representação esquemática dos plasmídeos pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2 e pcTPA. Siglas: Amp R - gene que confere resistência à ampicilina; CMV pro - promotor derivado do citomegalovírus; SV40 pro, promotor derivado do vírus símio 40; Neo R, gene que confere resistência à neomicina; Poly A SV40 - região de poliadenilação derivada do vírus símio 40; EctoE: sequência que codifica o ectodomínio (domínios I,II e III) da proteína E; NS1 - sequência que codifica a proteína NS1; Poly A BGH - região de poliadenilação derivada do hormônio do crescimento bovino; ColE1 ori - origem de replicação bacteriana.

3.3. Construção do plasmídeo pE3D2

A sequência do vírus da dengue sorotipo 2, cepa Nova Guiné C (NGC) foi utilizada para a clonagem da região que codifica os domínios I e II da proteína E. Para tal, a sequência de interesse foi selecionada no genoma viral no banco de dados GenBank (GenBank M29095). Consoante às estratégias de clonagem adotadas anteriormente pelo nosso grupo, o fragmento de interesse foi sintetizado comercialmente pela empresa GenScript (USA) e clonado no plasmídeo pcTPA fusionado à sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA e sob controle do promotor do CMV (Figura 3.2).

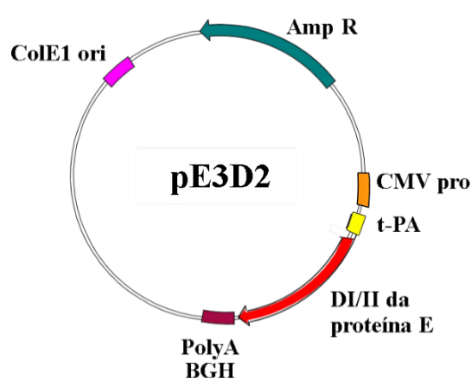


Figura 3.2: Representação esquemática do plasmídeo pE3D2. Siglas: Amp R - gene que confere resistência à ampicilina; CMV pro - promotor do citomegalovírus; DI/II da proteína E: sequência que codifica os domínios I/II da proteína E de DENV2; PolyA BGH - região de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino; ColE1 ori - origem de replicação bacteriana.

3.4. Purificação dos plasmídeos recombinantes

Para a produção de grande quantidade de DNA plasmideal, bactérias *Escherichia coli*, cepa DH5- α , transformadas com os plasmídeos recombinantes pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2 (clones 1, 2, 3, 4 e 5), pE3D2 ou pcTPA foram crescidas em meio LB (Luria-Bertani - 10 g de Luria-Bertani: triptona, 5 g de extrato de levedura, 10g de NaCl, água deionizada para completar 1 L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina, a partir dos estoques congelados. As culturas foram incubadas a 37° C sob agitação, durante a noite. No dia seguinte, foi feito um inóculo destas culturas em meio TB (Terrific Broth - 12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 mL de glicerol e 100 mL de solução 0,17 M de KH_2PO_4 e 0,72 M de K_2HPO_4 /L, água deionizada para completar 1 L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina e mantidas novamente à 37°C, sob agitação, durante a noite.

Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e purificados em colunas de troca iônica, utilizando “Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit” (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Foram utilizados 3 L de cultura bacteriana para cada coluna Giga. Os plasmídeos foram suspensos em água deionizada e armazenados a – 20 °C até o uso.

Os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro Bio Photometer (Eppendorf) no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, as concentrações destas amostras de DNA foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (4,84g de Tris, 1,142mL de ácido acético, 2mL de EDTA 0,5M, água deionizada para completar 1 L, pH 8,0), corados com Nancy-520 (Sigma-Aldrich) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). Para avaliação da integridade e pureza dos DNAs, os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição (Promega ou Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante, por 1 h a 37° C, com adição posterior de tampão de amostra 6X (*Blue/Orange loading Dye*, Promega) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, os plasmídeos foram visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados.

3.5. Transfecção de células BHK-21

Células de rim de hâms ter neonato BHK-21 (ATCC, do inglês, American Type Culture Collection, USA) foram mantidas em meio DMEM (do inglês Dulbecco’s Modified Eagle Medium - SIGMA) (10g de meio DMEM, 2,2g de Ca(HCO₂)₂, 2g de HEPES/L, pH7,4) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), à 37°C, sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. A monocamada celular foi lavada a cada dois dias com solução salina BSS (8g de NaCl, 0,4g de KCl, 0,012g de CaCl₂, 0,154g de MgSO₄.7H₂O, 0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15g de KH₂PO₄, 1,1g de glicose, 0,0025g de vermelho de fenol, água deionizada para completar 1L, pH 7,4). Para o repique das células BHK e obtenção de suspensão celular, a monocamada foi lavada com solução salina BSS-CMF (8g de NaCl, 0,4g de KCl, 0,1g de Na₂SO₄, 0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15g de KH₂PO₄, 1,1g de glicose, 0,0025g de vermelho de fenol e água deionizada para completar 1 L, pH 7,4) e dissociação posterior com tripsina (Invitrogen).

Para transfecção, 2 x 10⁴ células foram plaqueadas em lâminas contendo 8 câmaras (Lab-Tek, NUNC) e incubadas durante à noite sob as mesmas condições de

manutenção do cultivo. No dia seguinte, as células BHK-21 foram transfectadas com 0,4 µg dos plasmídeos recombinantes, pE1D2, pcTPANS1, pNS1/E/D2 ou pcTPA, misturados com 2 µL de lipofectamina (Invitrogen), em 400 µL de meio OPTIMEM (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 4h, o meio foi trocado por DMEM com 5% de SFB.

3.6. Imunofluorescência indireta

Após 24h, as células foram lavadas com solução salina BSS e posteriormente com tampão fosfato 0,1M. As células foram fixadas com 4,0% de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio e permeabilizadas com 0,6% de saponina em tampão fosfato com incubação por 15 min a temperatura ambiente. Para a detecção da expressão das proteínas recombinantes, as células foram incubadas em tampão fosfato com os anticorpos específicos por 1h à 37°C. A proteína NS1 foi detectada com soro policlonal anti-NS1 produzido em coelho inoculado com NS1 recombinante expressa em *E. coli* (Amorim *et al*, 2010), seguido da incubação com anti-IgG de coelho conjugado à Alexa 488 (verde) (Southern Biotech). A proteína E foi detectada com anticorpo específico 3H5 (monoclonal anti-domínio III da proteína E) produzido em camundongo, seguido da incubação com anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa 546 (vermelho) (Southern Biotech). Ao final do preparo das lâminas, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência modelo Nikon Eclipse 50i.

3.7. Imunização de camundongos com as vacinas de DNA e desafio com DENV2 por via intracerebral

Os experimentos com animais foram realizados segundo os princípios éticos determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (LW-14/12).

Grupos de camundongos BALB/c machos (n = 5-10), com 4 semanas de idade, foram inoculados com duas doses das vacinas de DNA: pE3D2, pcTPA, pNS1/E/D2, pE1D2 ou pcTPANS1 isoladamente, assim como com uma mistura destes dois últimos plasmídeos (50µg de pcTPANS1 + 50 µg de pE1D2 em 100 µl de PBS ou 100 µg de pcTPANS1 + 100 µg de pE1D2 em 100 µl de PBS). Além disso, houve um grupo controle que não recebeu nenhum DNA plasmideal. As doses de DNA, 100 µg/100 µl

de PBS, foram administradas em um intervalo de duas semanas, por via intramuscular (i.m.) nos quadríceps posteriores (50µg/pata), utilizando seringa de insulina com agulha ultrafina 30 G (Becton Dickinson). Duas semanas após a segunda inoculação dos plasmídeos, parte dos camundongos foram desafiados por via intracerebral com uma dose letal de aproximadamente 40 LD₅₀ de DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC), em 30µL de meio E199. Tal cepa foi gentilmente cedida no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), de BioManguinhos/FIOCRUZ. Em um dos ensaios de ELISPOT, camundongos inoculados por via intracerebral apenas com meio E199 (MOCK) foram utilizados como controle do desafio.

No início do experimento e quatro semanas após a primeira dose das vacinas, os animais foram sangrados por via retro orbital para obtenção dos soros pré-ímmunes e ímmunes, respectivamente. Todas as amostras de sangue obtidas foram processadas (centrifugação a 3000xg/5 min em microcentrífuga e coleta do sobrenadante) para a obtenção dos soros, que foram armazenados a -70°C até o uso.

Os animais foram monitorados durante 21 dias após o desafio quanto à mortalidade e aos graus de morbidade apresentados. A morbidade foi quantificada em uma escala subjetiva de 0 a 4: grau 0 = ausência de sinais clínicos; grau 1 = paralisia em uma das patas ou comprometimento da coluna vertebral; grau 2 = paralisia em uma das patas e comprometimento da coluna vertebral ou paralisias em ambas as patas; grau 3 = paralisia nas duas patas e comprometimento da coluna vertebral e 4 = morte. Após 21 dias, os animais foram sangrados por punção cardíaca e submetidos à eutanásia.

O esquema de imunização, coleta de sangue e desafio dos animais está representado na figura 3.3.

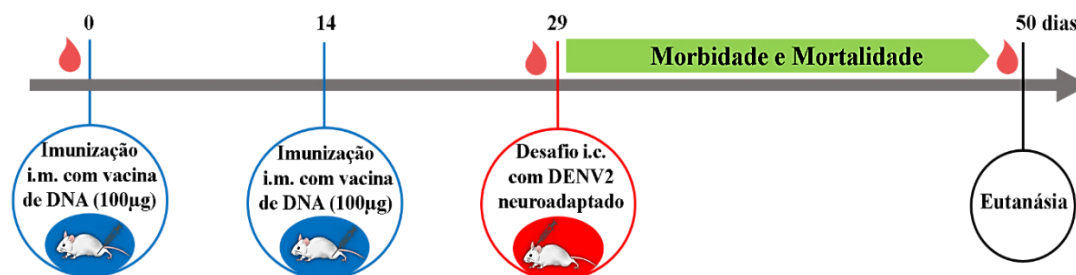


Figura 3.3: Esquema de imunização e desafio letal com DENV2 neuroadaptado. O símbolo () representa procedimentos de sangrias para obtenção de soros pré-ímmune e ímmune.

3.8. Depleção dos anticorpos específicos anti-DIII da proteína E de DENV2

Para exclusão (depleção) dos anticorpos anti-DIII da proteína E no soro dos camundongos imunizados com a vacina de DNA pE1D2, utilizamos uma coluna cromatográfica de afinidade HiTrap SP HP (GE Healthcare Life Sciences), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, a proteína recombinante correspondente ao domínio III da proteína E de DENV2 foi acoplada à coluna, diluída em 500 µL de tampão de acoplamento do kit comercial (Coupling Buffer – 0,4 M NaHCO₃, 1 M NaCl). Tal proteína, cedida pelo nosso colaborador Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira (Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, USP), foi expressa em *Escherichia coli*, purificada e submetida ao processo de *refolding* (Jaime *et al*, 2010). A coluna HiTrap foi incubada durante 30 min com o domínio III para o acoplamento da proteína na matriz e em seguida a mesma foi lavada com tampões do Kit alternadamente: tampão A (0,5 M etanolamina, 0,5 M NaCl, pH 8.3) e B (0,1 M acetado de sódio, 0,5 M NaCl, pH 4). Para ajuste do pH, a coluna HiTrap foi lavada com 2 mL de PBS. Na etapa seguinte, o soro obtido dos camundongos imunizados com duas doses da vacina pE1D2 foi diluído 4 vezes em tampão de ligação (Binding Buffer – 50mM Tris, 150mM NaCl, pH=7.5), fornecido pelo kit, e imediatamente aplicado à coluna. Sendo assim, os anticorpos contra o domínio III presentes no soro se ligariam à proteína recombinante acoplada à coluna. Em seguida, foi recuperada da coluna a fração de soro depletada de anticorpos anti-DIII (enriquecida de anticorpos contra os DI/II) em tampão de ligação. Posteriormente, foi colocado na coluna um tampão de eluição (Elution Buffer – 0,1M Glicina-HCl, pH=2.9) fornecido pelo kit para recuperação dos anticorpos contra DIII ligados a matriz da coluna. O pH da fração enriquecida de anticorpos anti-DIII foi equilibrado com tampão Tris-HCl, pH=8.0.

Para avaliar a eficiência do protocolo empregado, foram realizados ensaios de ELISA (ver item 3.9, página 35) para detecção de IgG total contra o ectodomínio da proteína E ou somente o seu domínio III. Após a confirmação da depleção dos anticorpos anti-DIII, a amostra foi submetida ao ensaio de PRNT₅₀, para verificar a presença de anticorpos neutralizantes contra DENV2.

3.9. Ensaio de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Como antígeno de fase sólida nas placas de ELISA foram utilizados: o ectodomínio da proteína E (E80) (0,4 µg/100µL de PBS/poço), cedida pela Dra. Silvia Beatriz Boscardin (Instituto de Ciências Biomédicas, USP), ou somente o domínio III da proteína E (DIII) (0,2 µg/100µL de PBS/poço) produzidas em *E. coli*, a proteína NS1 produzida em *Drosophila melanogaster* (cedida pela Merck através de colaboração) (0,2 µg/100 µL de PBS/poço). Em um dos ensaios, também foi utilizado o DIII desnaturado por calor (100°C por 10 min). As placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) foram incubadas com tais antígenos por 1h a 37°C. Posteriormente, os poços foram bloqueados a 4°C durante a noite, com 200 µL de tampão de bloqueio/poço (leite desnatado 2% em PBST). No dia seguinte, este tampão foi desprezado e as placas foram lavadas com PBST. Os soros coletados 4 semanas após a primeira dose da vacina foram diluídos serialmente (fator de diluição: 5), adicionados em duplicatas às placas de ELISA e incubados por 1 h a 37° C. A seguir, as placas foram lavadas com PBST e incubadas por 1 h a 37° C, com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase - Southern Biotechnology), diluído em PBS (1:4000). As placas foram então lavadas com PBST e a reação foi observada após incubação com solução reveladora (10mg de O-fenilendiamina dihidrocloro - Sigma, dissolvidos em 25mL de tampão citrato fosfato 33mM, pH5,0 e 10µL de peróxido de hidrogênio), no escuro, a temperatura ambiente. Após 20 min, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 9N, e as densidades óticas (D.O.) foram lidas no comprimento de onda de 490 nm no leitor de microplaca (Spectra Max 190, Molecular Devices).

Os títulos de anticorpos específicos para cada proteína foram estabelecidos como a diluição recíproca dos soros que apresentaram uma absorbância acima dos soros pré-ímmunes. Os cálculos foram realizados através de uma curva de regressão linear, utilizando os valores de absorbância, acima e abaixo do valor obtido com o soro pré-ímmune.

3.10. Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)

Células VERO foram mantidas em meio E199 suplementado com 5% de SFB à 37°C, sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para obtenção da suspensão celular e posterior plaqueamento, a monocamada celular foi lavada com solução salina (1 g de EDTA, 0,0025g de vermelho de fenol, PBS para completar 1 L) e dissociada com tripsina (Invitrogen). O teste de PRNT foi realizado em placas de cultura de 24 poços (Corning). Previamente ao ensaio de PRNT, os soros imunes coletados 4 semanas após a primeira dose das vacinas de DNA foram descongelados e aquecidos a 56°C por 30 min para inativação do sistema complemento.

Inicialmente, 24 h antes do ensaio, as células foram adicionadas às placas de cultura na concentração de 10⁵ células/poço em 1,0 mL de meio E199 adicionado de 5% de SFB e mantidas à 37°C, sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. O ensaio de PRNT foi realizado com 60-80% de confluência da monocamada celular.

No dia seguinte, os soros imunes inativados foram diluídos serialmente (fator de diluição 2) em meio E199. Estes soros foram incubados com uma suspensão viral em meio E199 contendo aproximadamente 50 PFU, de DENV2, isolado 44/2, por 1h a 37°C. Após este período, a suspensão de vírus e soro foi adicionada às placas de 24 poços em volume de 200 µl/poço e as placas foram incubadas por 1h a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado, descartado e 1,0 mL de meio semissólido E199 adicionado de carboximetilcelulose (CMC - Sigma) (meio E199 e 2% p/v de CMC) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 5 dias à 37°C, sob atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Após este período, as monocamadas de células foram fixadas com solução de formalina a 10% e coradas com 0,02% de cristal violeta. As placas de lise foram contadas manualmente e a titulação de anticorpos neutralizantes foi calculada tomando-se como base a maior diluição do soro capaz de reduzir em 50% o número de placas de lise (PRNT), quando comparada ao grupo controle (células Vero infectadas com DENV2 pré incubado com soro pré-imune).

3.11. Ensaio de ELISPOT (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSpot*)

Os ensaios de ELISPOT foram realizados para detectar células produtoras de IFN-γ mediante estímulo com peptídeos sintéticos. A resposta celular induzida com a

vacina pE1D2 foi avaliada mediante estímulo com uma biblioteca de peptídeos contidos na sequência do ectodomínio da proteína E de DENV2 NGC (Mimotopes Pty Ltd ABN). Esta biblioteca é composta por 98 peptídeos com extensão de 15 aminoácidos cada, sendo, portanto, possível a ligação dos mesmos a moléculas de MHC de classe I e II. Cada peptídeo foi construído adicionando-se os 4 aminoácidos seguintes da proteína e repetindo 11 aminoácidos da sequência anterior. Para avaliação da vacina de DNA pNS1/E/D2, foram utilizados os peptídeos ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³, contido na proteína NS1, ou com ³³¹SPCKIPFEI³³⁹, contido na proteína E, ambos descritos na literatura como específicos para células TCD8⁺.

Os animais foram imunizados conforme descrito no item 3.5 e submetidos a eutanásia 4 semanas após a 1^a dose de DNA. Os baços foram coletados e macerados com PBS em peneiras. As células foram transferidas para tubos contendo 15 mL de PBS e sedimentadas por 10 min para remoção das cápsulas e agregados maiores. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 min a 500xg, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 5 mL da solução BD Pharm Lyse (BD Biosciences) estéril por 10 min para lise de hemácias. Transcorrido 10 min, foi adicionado PBS para inativação da solução de lise e esta mistura foi centrifugada por 10 min a 500xg. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas para a contagem das células viáveis com a utilização do corante azul de Trypan. As suspensões celulares foram ajustadas na concentração de 5x10⁶ células/mL e analisadas em triplicatas com o *kit* BD ELISPOT IFN- γ Mouse gamma-Set (BD ELISPOT), conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram acondicionadas em placas de 96 poços (Millipore, Bedford), previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- γ de camundongo (10 mg/mL, 50 μ L/poço) a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS e bloqueadas com meio RPMI-1640 (SIGMA) suplementado com 1% de SFB (200 μ L/poço) por 2 h a 37°C. Essas placas receberam 100 μ L/poço de suspensão celular e, posteriormente, foram adicionados mais 100 μ L/poço com solução dos peptídeos sintéticos (2,0 μ g/poço) ou de concanavalina A (1,0 μ g/poço). Para o controle negativo, as células foram incubadas somente com 100 μ L de meio RPMI. As placas foram mantidas por 18 h a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após este período, as células foram desprezadas e as placas foram lavadas três vezes com PBS e 5 vezes com PBST, incubadas por 2 h com anticorpo de detecção anti-IFN- γ biotilado,

novamente lavadas e incubadas com estreptavidina/peroxidase por 1 h. Finalmente, as placas foram lavadas com PBST e reveladas por 20 min com a adição do substrato AEC (BD/Pharmingen) e peróxido de hidrogênio (SIGMA). A reação foi interrompida com a lavagem da placa em água corrente. Os *spots* foram contados no leitor automatizado Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd.) da Plataforma Multiusuário de ELISPOT (RPT08C) da Fiocruz.

3.12. Análise computacional da localização dos peptídeos selecionados

A inferência da estrutura tridimensional da proteína E utilizada na localização dos peptídeos selecionados foi realizada através de uma varredura na base de dados SWISS-MODEL, pelo o alinhamento da sequência de aminoácidos desta proteína.

A estrutura tridimensional da proteína E que apresentou maior identidade foi localizada no banco de dados RCSB PDB (do inglês, *Protein Data Base*), sob identificador 3j27 (Zhang *et al*, 2012). A visualização e localização dos peptídeos na estrutura tridimensional dimérica da proteína E foi realizada na interface Maestro 11.1 do software Schrödinger 2017-1 (LLC, New York, NY, USA).

3.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (La Jolla, EUA), versão 5.02, com nível de significância mínima de 95%. As diferenças estatísticas foram avaliadas utilizando o teste de comparações múltiplas não paramétrico de Kruskal-Wallis nas análises de grau de morbidade, ELISPOT e PRNT. Para as análises de mortalidade e morbidade (percentagem) foi utilizado o teste de qui-quadrado.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Resposta imune gerada com uma vacina de DNA baseada no ectodomínio da proteína E (pE1D2)

A vacina de DNA pE1D2 foi construída anteriormente pelo grupo e contém a sequência que codifica o ectodomínio (domínios I, II e III) da proteína E de DENV2. Resultados anteriores mostraram que 100% dos camundongos BALB/c imunizados com esta vacina sobreviveram ao desafio com uma dose letal de DENV2. Estes animais apresentaram uma resposta humoral, com produção de anticorpos neutralizantes, e celular, com produção de IFN- γ (Azevedo *et al*, 2011). Sendo assim, nesta tese analisamos com mais detalhes a resposta de anticorpos neutralizantes gerados com a vacina pE1D2, avaliando contra que domínios da proteína E eles foram gerados, e a resposta imune celular, com a identificação dos epítomos imunodominantes capazes de induzir a produção de IFN- γ .

4.1.1. Análise da resposta de anticorpos neutralizantes após depleção de anticorpos específicos contra o domínio III da proteína E

Para avaliarmos o papel dos anticorpos gerados contra os diferentes domínios da proteína E na neutralização contra DENV2, realizamos ensaios de depleção dos anticorpos anti-domínio III (DIII) no soro obtido com a vacina pE1D2 e ensaios de PRNT. O ensaio de ELISA foi utilizado para quantificar os títulos de anticorpos gerados em camundongos BALB/c após imunização com a vacina de DNA pE1D2, antes e após a depleção de anticorpos específicos contra o DIII da proteína E de DENV2. Para este propósito, amostras de soro coletadas 2 semanas após a segunda dose com pE1D2 foram submetidas à coluna cromatográfica HiTrap SP HP, na qual a proteína DIII foi previamente acoplada. A fração não ligante à coluna (enriquecida de anticorpos anti-DI/DII) foi avaliada quanto à presença de anticorpos contra o DIII da proteína E.

Foram realizados dois experimentos independentes, com diferentes pools de soro de animais imunizados com pE1D2 e dois lotes da proteína recombinante DIII. No primeiro experimento, conforme esperado, a fração de soro pE1D2 depletada apresentou um baixo nível de anticorpos contra o DIII da proteína E (título=64) quando comparada

ao soro pE1D2 não depletado (título=1244) (Figura 4.1). Estes dados confirmaram a eficiência do protocolo de depleção empregado.

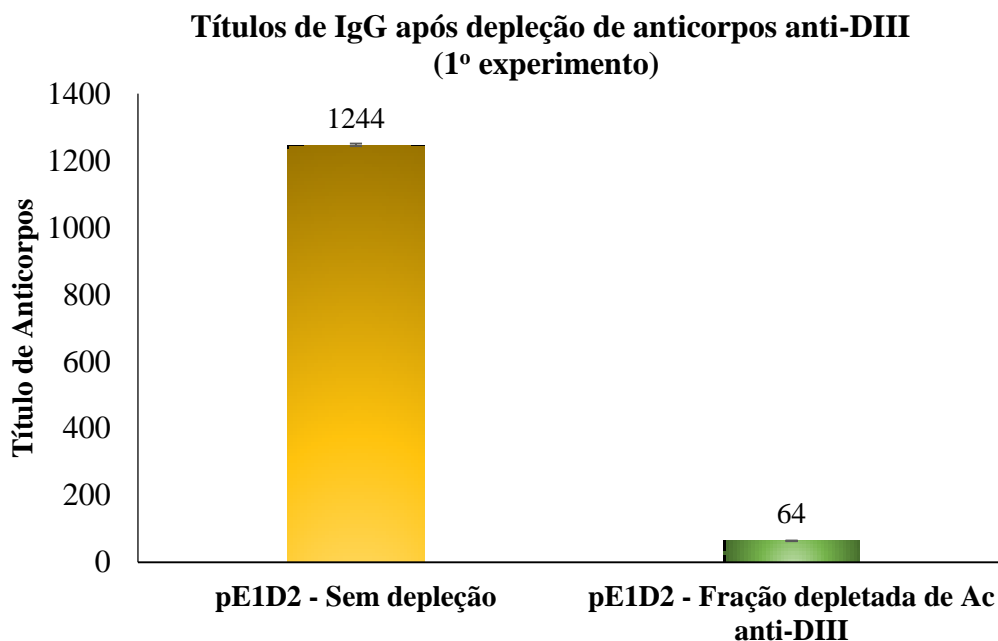


Figura 4.1: Resposta de IgG no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (primeiro experimento). Titulação por ELISA dos anticorpos IgG anti-DIII da proteína E de DENV2 no soro dos camundongos (n=5) coletado 2 semanas após a segunda dose com o plasmídeo pE1D2. Os soros foram agrupados em um pool que foi posteriormente depletado de anticorpos anti-DIII. As amostras foram testadas em duplicata nas placas de ELISA e o resultado foi representado através da média dos valores obtidos. As barras representam os desvios padrão.

Posteriormente, a resposta imune humoral foi avaliada quanto à presença de anticorpos neutralizantes no soro dos camundongos imunizados com pE1D2 antes e após a depleção de anticorpos específicos contra DIII. A mesma fração de soro pE1D2 depletada, previamente avaliada por ELISA, foi utilizada em ensaios de redução de plaques (PRNT) utilizando DENV2. Resultados revelaram níveis mais altos de anticorpos neutralizantes após a depleção de anticorpos anti-DIII (título=640) quando comparado ao soro controle não depletado (título=224) (Figura 4.2). Vale ressaltar que as frações obtidas da coluna de afinidade foram eluídas em tampões específicos fornecidos pelo fabricante. A fração de soro depletada de anticorpos contra DIII foi retirada da coluna no tampão Binding/Washing Buffer. Sendo assim, nos ensaios de soroneutralização foram adicionados controles de soros diluídos nesta solução de forma a excluir ou normalizar qualquer interferência advinda da composição dos tampões inerente a metodologia utilizada. Contudo, não foi observada diferença significativa dos resultados de soroneutralização atrelada à composição dos tampões do kit comercial.

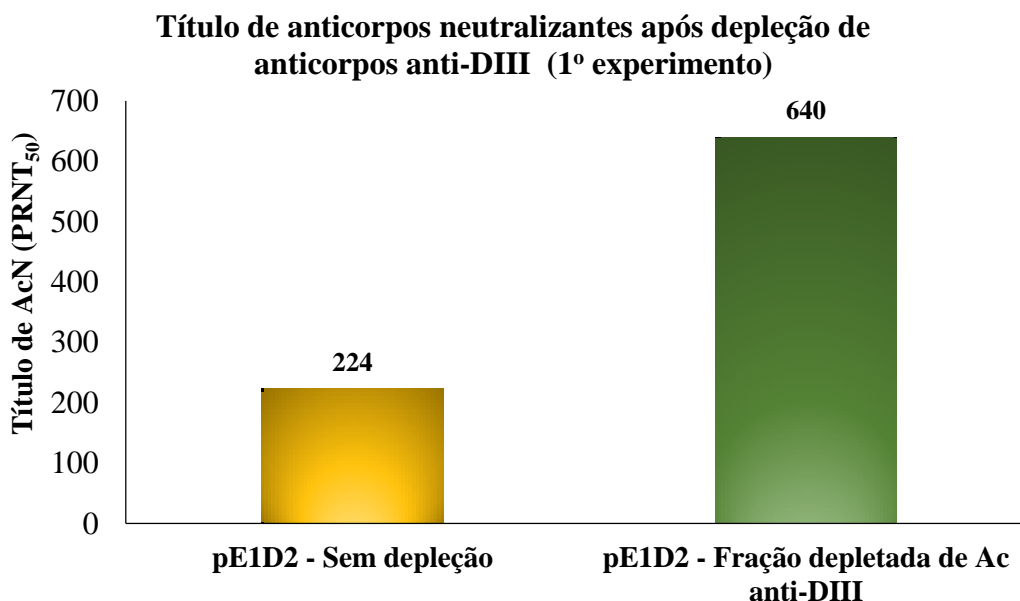


Figura 4.2: Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (1º experimento). Títulação de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos imunizados com o pE1D2 e agrupados em pool. As amostras foram testadas em duplicatas e o resultado foi representado através da média dos valores obtidos. Ensaio de PRNT realizado com DENV2 e monocamadas de células Vero.

Para comprovar o aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes após a depleção de anticorpos anti-DIII, foi realizado um segundo experimento utilizando um novo lote de proteína DIII, que foi acoplada a outra coluna HiTrap SP HP, e outro pool de soro obtido de camundongos imunizados com pE1D2. Ademais, neste novo ensaio, utilizamos também como ferramenta nos testes de ELISA a proteína recombinante E80, correspondente ao ectodomínio (DI/II/III) da proteína E expressa em *E. coli* e submetida ao processo de *refolding*.

Conforme esperado, a fração de soro pE1D2 depletada não apresentou títulos detectáveis de anticorpos contra o DIII da proteína E (título=0) ao passo que o soro pE1D2 não depletado apresentou título de 1112 (Figura 4.3, barras vermelhas). Por outro lado, foram detectados anticorpos contra a proteína E80 tanto na fração de soro pE1D2 depletada de anti-DIII (título=1160) quanto no controle pE1D2 não depletado (título=1324), indicando a presença majoritária de anticorpos anti-DI/II na fração de soro pE1D2 depletada (Figura 4.3, barras azuis). Novamente, estes resultados reforçam a eficiência do protocolo de depleção empregado neste projeto.

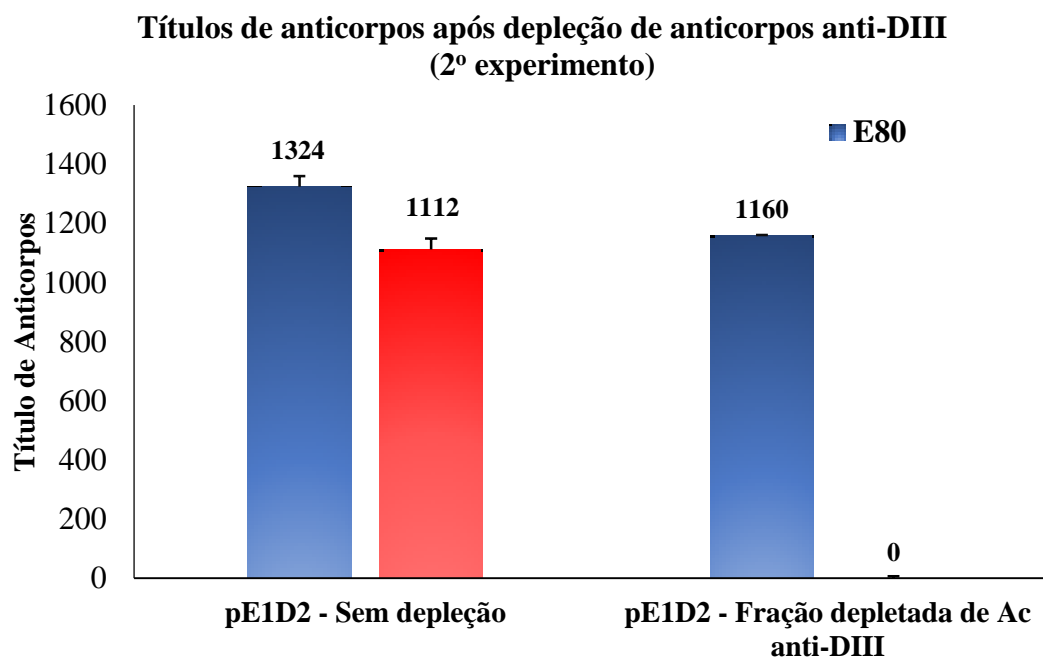


Figura 4.3: Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (2º experimento). Titulação por ELISA dos anticorpos anti-ectodomínio (azuis) e anti-DIII (vermelhas) da proteína E de DENV2 no soro dos camundongos (n=5) coletado 2 semanas após a segunda dose de pE1D2. Os soros foram agrupados em um pool que foi posteriormente depletado de anticorpos anti-DIII. As amostras foram testadas em duplicata nas placas de ELISA e o resultado foi representado através da média dos valores obtidos. As barras representam os desvios padrão.

Em seguida, foi realizado o ensaio de PRNT com estas amostras de soros pE1D2, depletados ou não de anticorpos anti-DIII. Neste ensaio, mais uma vez observamos níveis mais altos de anticorpos neutralizantes no soro pE1D2 após a depleção dos anticorpos anti-DIII em comparação aos títulos detectados no soro pE1D2 não depletado (Figura 4.4). Tal achado, embora em maior magnitude, confirma os resultados prévios e evidencia a importância de epítomos antigênicos contidos nos domínios I e II da proteína E na neutralização viral.

Títulos de anticorpos após depleção de anticorpos anti-DIII (2º experimento)

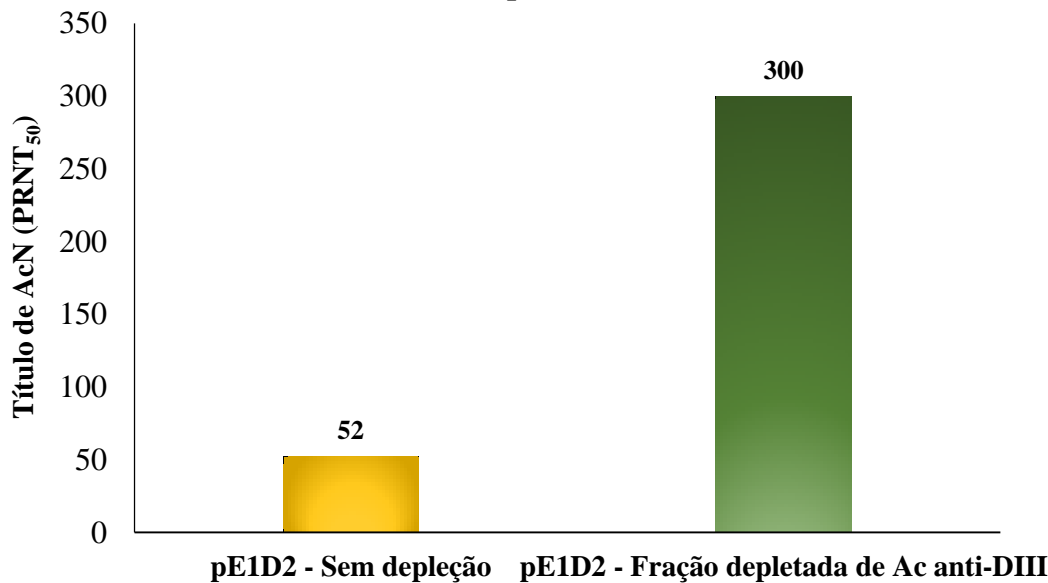


Figura 4.4: Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII (2º experimento). Titulação de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos imunizados com o pE1D2 e agrupados em pool. As amostras foram testadas em duplicatas e o resultado foi representado através da média dos valores obtidos. Ensaio de PRNT realizado com DENV2 e monocamadas de células Vero.

Além destes estudos, avaliamos se os anticorpos gerados com a vacina pE1D2 específicos contra o domínio III reconheciam epítomos conformacionais presentes na proteína recombinante DIII. Para isto, foi realizado um ensaio de ELISA utilizando como antígeno de fase sólida tanto a proteína desnaturada por calor quanto intacta. Observamos uma diminuição drástica no título de anticorpos quando utilizamos a proteína DIII desnaturada (título=224) em comparação aos títulos detectados com a proteína na sua forma intacta (título=948) (Figura 4.5). Tais resultados sugerem que os anticorpos anti-DIII reconhecem predominantemente epítomos conformacionais.

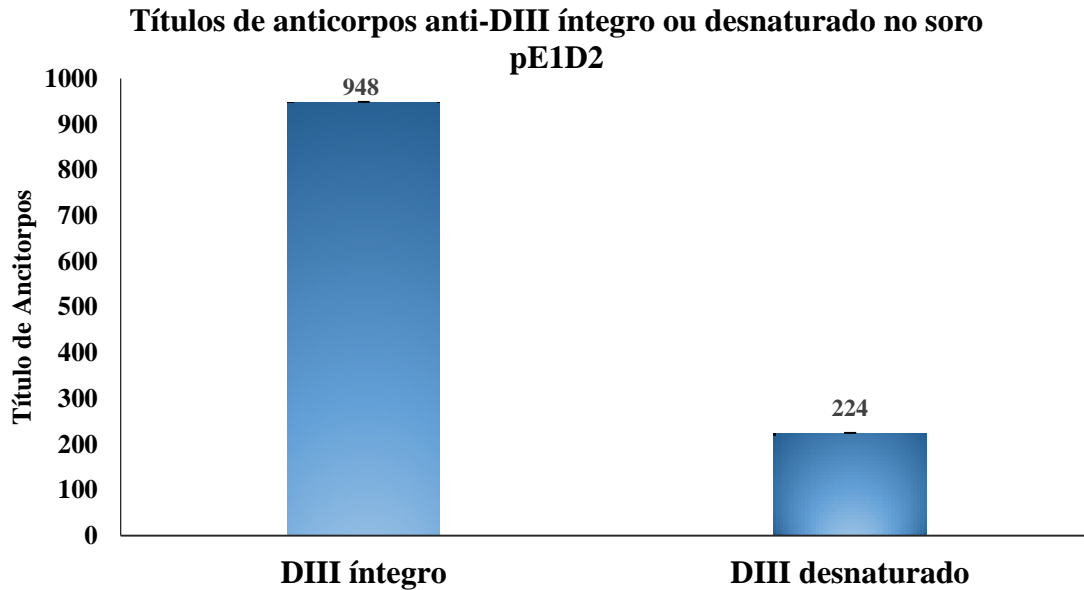


Figura 4.5: Resposta de anticorpos que reconhecem o DIII íntegro ou desnaturado no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2, depletado ou não de anticorpos anti-DIII. Titulação de anticorpos no soro de camundongos imunizados com o pE1D2 e agrupados em pool. As amostras foram testadas em duplicatas e cada barra representa a média dos valores obtidos. As barras representam os desvios padrão.

4.1.2. Avaliação da resposta imune celular em camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ

A resposta imune celular induzida com a vacina de DNA pE1D2 foi avaliada especificamente quanto à presença de células produtoras de IFN- γ frente ao estímulo com uma biblioteca de peptídeos contidos na proteína E de DENV2. Os esplenócitos coletados 2 semanas após a segunda dose da vacina pE1D2 ou com controle pCTPA foram incubados com os peptídeos sintéticos, inicialmente agrupados em pools e posteriormente analisados individualmente. Como controle da resposta celular mediada pela vacina pE1D2, foi utilizado o peptídeo sintético $^{331}\text{SPCKIPFEI}^{339}$ contido na proteína E, descrito na literatura como específico para células TCD8⁺. A ativação celular foi avaliada quanto à produção de IFN- γ por células formadoras de spots em ensaios de ELISPOT. O valor de corte assumido arbitrariamente nos ensaios foi de 5 spots.

Em um mapeamento inicial, os peptídeos da biblioteca foram agrupados em 10 pools contendo 10 peptídeos sequenciais cada. Os esplenócitos isolados do baço de animais inoculados com pE1D2 foram responsivos aos pools 4, 8 e 9 (número de *spots*:

18, 7 e 19, correspondentes à média dos pools 4, 8 e 9 respectivamente) (Figura 4.6, barras azuis). Como esperado, as células dos animais inoculados com o controle negativo, pcTPA, não reagiram a nenhum dos pools de peptídeos (Figura 4.6, barras vermelhas). Como validação da resposta celular induzida após imunização, as células dos animais inoculados com pE1D2 foram responsivas ao estímulo com peptídeo sintético $^{331}SPCKIPFEI^{339}$, contido na proteína E (número de *spots*: 131). Por outro lado, os esplenócitos de todos os grupos de animais responderam inespecificamente com produção de IFN- γ na presença da ConA, sem diferenças significativas entre os grupos, demonstrando a viabilidade das células durante a realização do experimento (Figura 4.6).

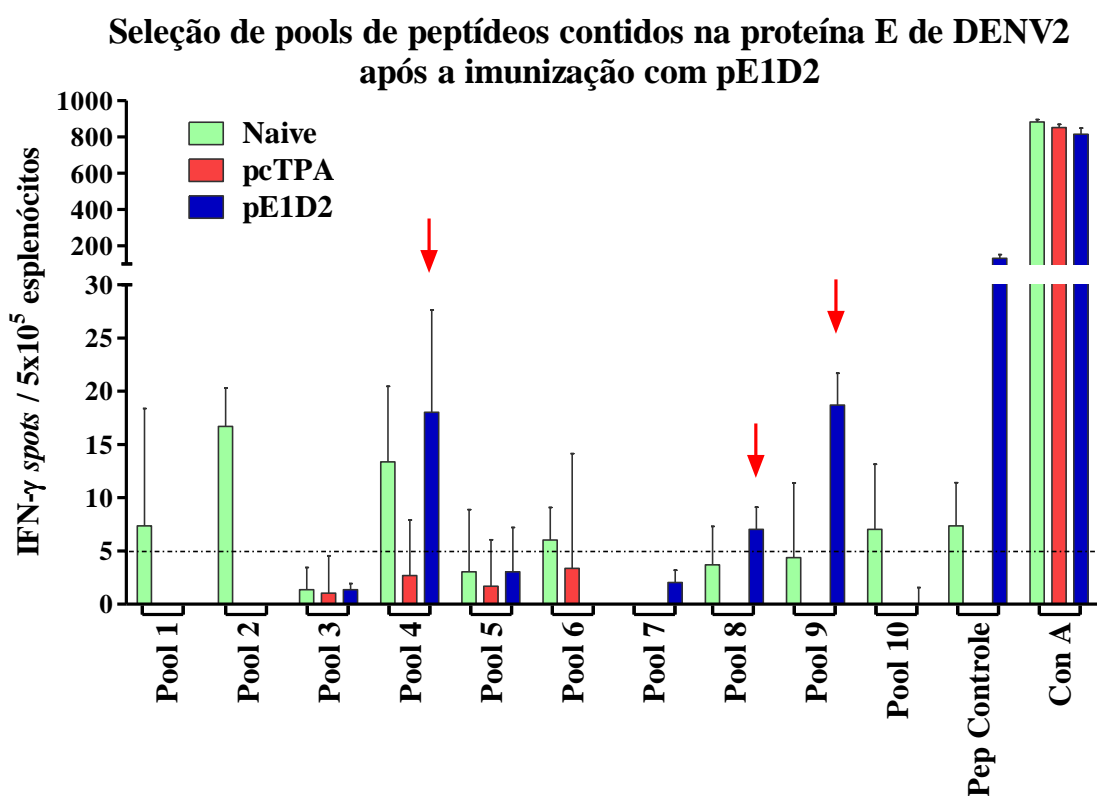
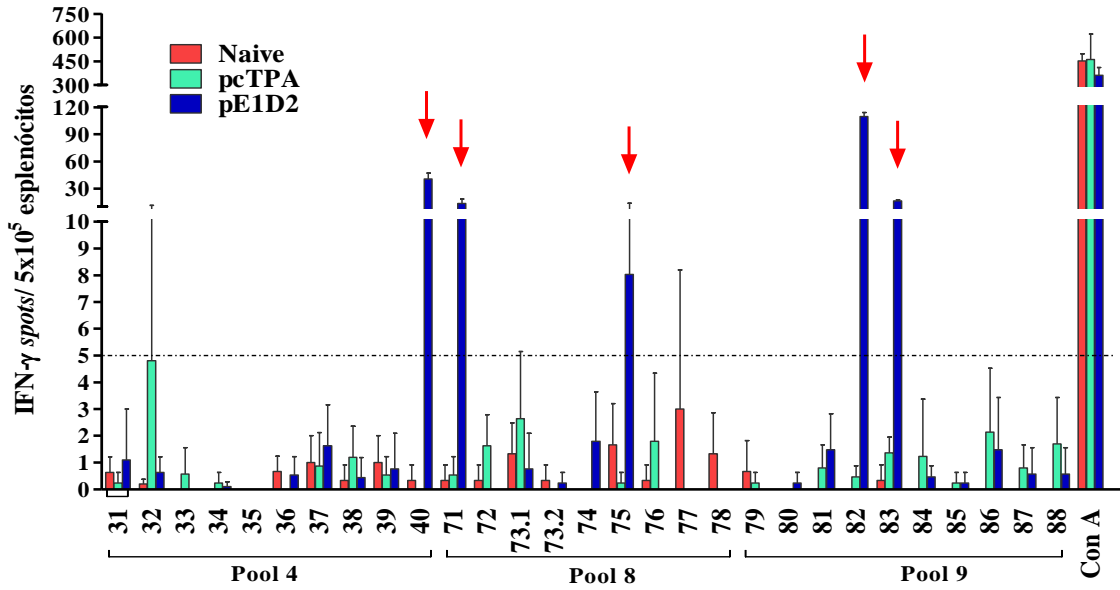


Figura 4.6: Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E após imunização com a vacina de DNA pE1D2. A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pE1D2 e com controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de DENV2, agrupados em pools, com peptídeo controle $^{331}SPCKIPFEI^{339}$, ou com concanavalina A (ConA) como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . As barras representam as médias dos valores obtidos com o desvio padrão. As setas vermelhas representam os pools que foram selecionados para posterior avaliação e identificação de peptídeos individuais. A linha pontilhada indica o valor de corte (spots >5) assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos.

Posteriormente, foi realizado um ensaio de ELISPOT para abertura dos pools 4, 8 e 9 em peptídeos individuais com o objetivo de identificar os epítomos envolvidos na resposta imune mediada pela vacina de DNA pE1D2. Os esplenócitos dos camundongos inoculados com pE1D2 responderam positivamente, com produção de IFN- γ , ao estímulo com os peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83 (número de *spots*: 41, 14, 8, 109 e 17, correspondente à média de *spots* dos peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83 respectivamente) (Figura 4.7A, barras azuis). Um ensaio de ELISPOT subsequente confirmou estes resultados. As células foram novamente reativas ao estímulo com estes peptídeos (número de *spots*: 168, 15, 11, 196, e 49; correspondente à média de *spots* dos peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83 respectivamente) (Figura 4.7B, barras azuis). Em ambos os ensaios, os esplenócitos isoladas de animais inoculados com o controle negativo, pcTPA, não responderam ao estímulo com tais peptídeos. Além disso, conforme esperado, as células isoladas de todos os grupos foram reativas ao estímulo inespecífico com ConA, validando a viabilidade celular durante o teste (Figura 4.7A-B).

Estes resultados sugerem a participação de tais epítomos (peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83) na modulação da resposta imune celular, em diferentes magnitudes, mediada pela imunização com a vacina de DNA pE1D2.

A Abertura dos pools de peptídeos contidos na proteína E após imunização com a vacina pE1D2



B Confirmação dos peptídeos contidos na proteína E após imunização com pE1D2

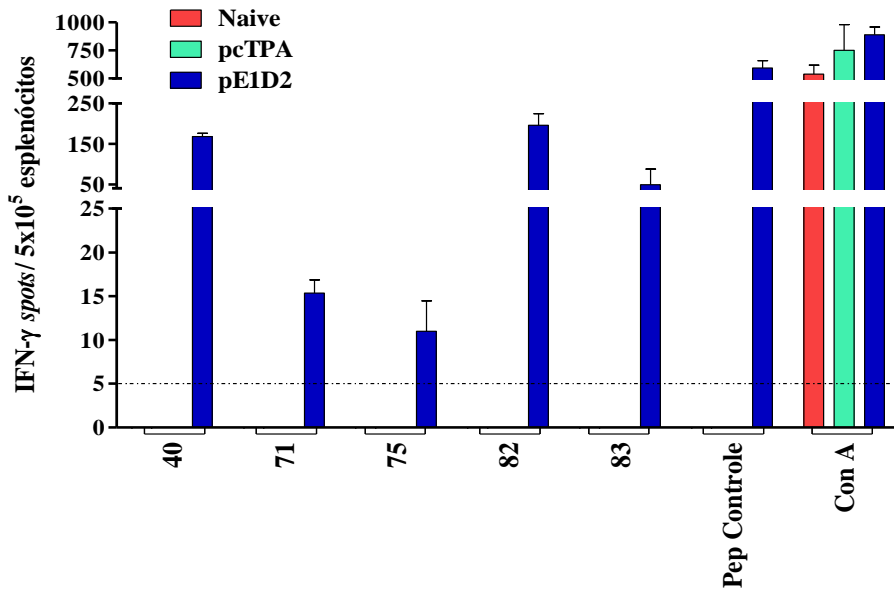


Figura 4.7: Identificação (A) e confirmação (B) de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E após abertura dos pools 4, 8 e 9. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de DENV2, com peptídeo controle $^{331}SPCKIPFEI^{339}$, ou com concanavalina A (ConA) como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . As barras representam as médias dos valores obtidos com o desvio padrão. As setas vermelhas (A) indicam os peptídeos selecionados para ensaio de ELISPOT confirmatório. A linha pontilhada indica o valor de corte (spots >5) assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos.

4.1.2.1. Avaliação da resposta celular em camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 e desafiados com DENV2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ

Ensaio de ELISPOT também foram realizados para avaliação da resposta imune celular nos animais vacinados com pE1D2 e desafiados com DENV2. Os esplenócitos foram isolados 21 dias após o desafio com DENV2 e incubados com os peptídeos sintéticos da biblioteca, inicialmente agrupados em pools e posteriormente analisados individualmente, de modo semelhante aos estudos com animais somente vacinados. Como controle do desafio com DENV2, células obtidas de camundongos inoculados por via intracerebral apenas com o meio E199 (MOCK) foram incubadas com os mesmos peptídeos sintéticos. O valor de corte assumido nos ensaios foi de 5 *spots*.

Em relação ao grupo de animais apenas desafiados com DENV2, foi observada a produção de IFN- γ após estímulo com os pools 3, 4, 6, 8, 9 (número de spots: 33, 13, 7, 39, e 26, correspondente às médias de *spots* dos pools 3, 4, 6, 8 e 9, respectivamente) (Figura 4.8). Observamos que os pools 3 e 6 continham peptídeos capazes de ativar produção de IFN- γ exclusivamente nos esplenócitos oriundos dos animais desafiados com DENV2 e não imunizados (Figura 4.8, barras vermelhas). Por outro lado, as células isoladas dos animais imunizados com pE1D2 e desafiados foram responsivas e secretaram IFN- γ mediante incubação com os pools 2, 4, 5, 7, 8, 9 e 10 (número de spots: 2, 75, 25, 18, 44, 223, 13; correspondente às médias de *spots* dos pools 2, 4, 5, 7, 8, 9 e 10, respectivamente). As células dos camundongos imunizados com pE1D2 e desafiados com DENV responderam aos peptídeos contidos nos pools 2, 5, 7, e 10 (Figura 4.8, barras azuis), o que não foi observado quando testamos as células dos animais somente vacinados (Figura 4.6) ou somente inoculados com DENV2 (Figura 4.8, barras vermelhas). De acordo com o previsto, os esplenócitos do grupo inoculado com MOCK não responderam positivamente aos pools de peptídeos. Ademais, as células dos animais imunizados com pE1D2 e/ou desafiados com DENV2 foram reativas a incubação com o peptídeo controle $^{331}SPCKIPFEI^{339}$, assim como com estímulo inespecífico da ConA, validando o ensaio de ELISPOT.

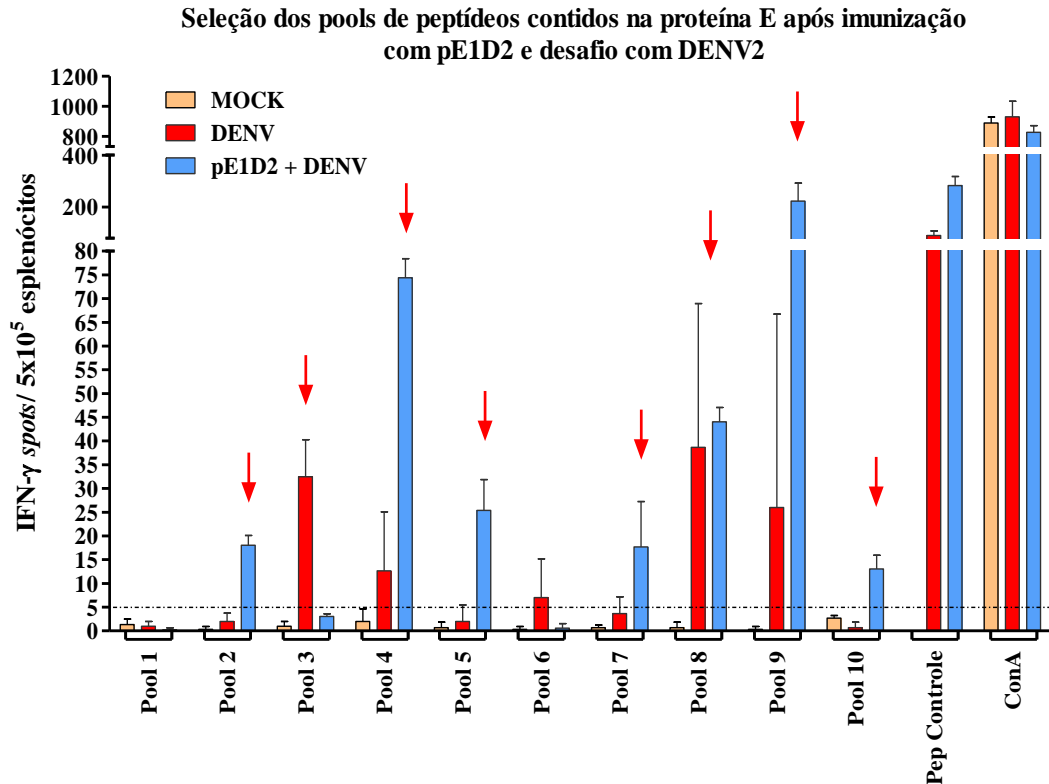


Figura 4.8: Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E através da quantificação de células produtoras de IFN- γ após imunização com a vacina de DNA pE1D2 e desafio com DENV2. A produção de IFN- γ induzida pela imunização com vacina de DNA pE1D2 e desafio com DENV2 foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de DENV2, agrupados em pools, com peptídeo controle 331 SPCKIPFEI 339 , ou com concanavalina A (ConA) como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . As barras representam as médias dos valores obtidos com o desvio padrão. As setas vermelhas (A) representam os pools que foram selecionados para posterior teste dos peptídeos individuais. A linha pontilhada indica o valor de corte (spots >5) assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos.

Devido ao número alto de pools selecionados (2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10), foram realizados dois experimentos independentes de ELISPOT para mapeamento de peptídeos individuais imunogênicos após imunização com pE1D2 e desafio com DENV2.

No primeiro experimento de abertura dos pools 2, 8, e 10, os esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados foram reativos ao estímulo com os peptídeos 75 e 98 (média de número de *spots* igual a 8 para ambos os peptídeos) (Figura 4.9A, barras azuis). Quanto ao grupo dos animais apenas desafiados com DENV2, não foi observada positividade acima do valor de corte (*spots*>5) após incubação com quaisquer dos peptídeos contidos nos pools 2, 8, e 10 (Figura 4.9A, barras vermelhas).

Em relação a abertura dos pools 4, 5, 7 e 9, as células dos camundongos imunizados e desafiados com DENV2 foram reativas e produziram IFN- γ mediante estímulo com os peptídeos 39, 40, 63, 64, 65, 82, 83 e 86 (número de *spots*: 51, 12, 17, 15, 105, 17, 17 e 10, correspondentes à média de *spots* dos peptídeos 39, 40, 63, 64, 65, 82, 83 e 86, respectivamente) (Figura 4.9B, barras azuis). Ainda não foi possível a avaliação individual dos peptídeos agrupados no pool 3, pois estávamos aguardando um novo kit de ELISPOT que já chegou e, portanto, estes testes serão realizados em breve.

Os peptídeos selecionados foram avaliados em um ensaio de ELISPOT confirmatório (Figura 4.9C). As células dos animais imunizados com pE1D2 e desafiados com DENV2 foram novamente reativas ao estímulo com os peptídeos 40, 71, 75, 82, 86 e 98. Dentre estes, apenas os peptídeos 40, 82 e 86 também estimularam os esplenócitos dos animais apenas desafiados com DENV2. Embora estas células tenham respondido positivamente aos peptídeos 63, 64, 65 e 66 na abertura do pool 7, tal resultado não foi confirmado (Figura 4.9C). Os peptídeos 39 e 84 ainda não foram avaliados em ensaio confirmatório. De acordo com o esperado, as células de todos os grupos responderam positivamente à ConA e as células oriundas dos animais imunizados e desafiados ou somente desafiados com DENV2 responderam ao peptídeo controle $^{331}SPCKIPFEI^{339}$.

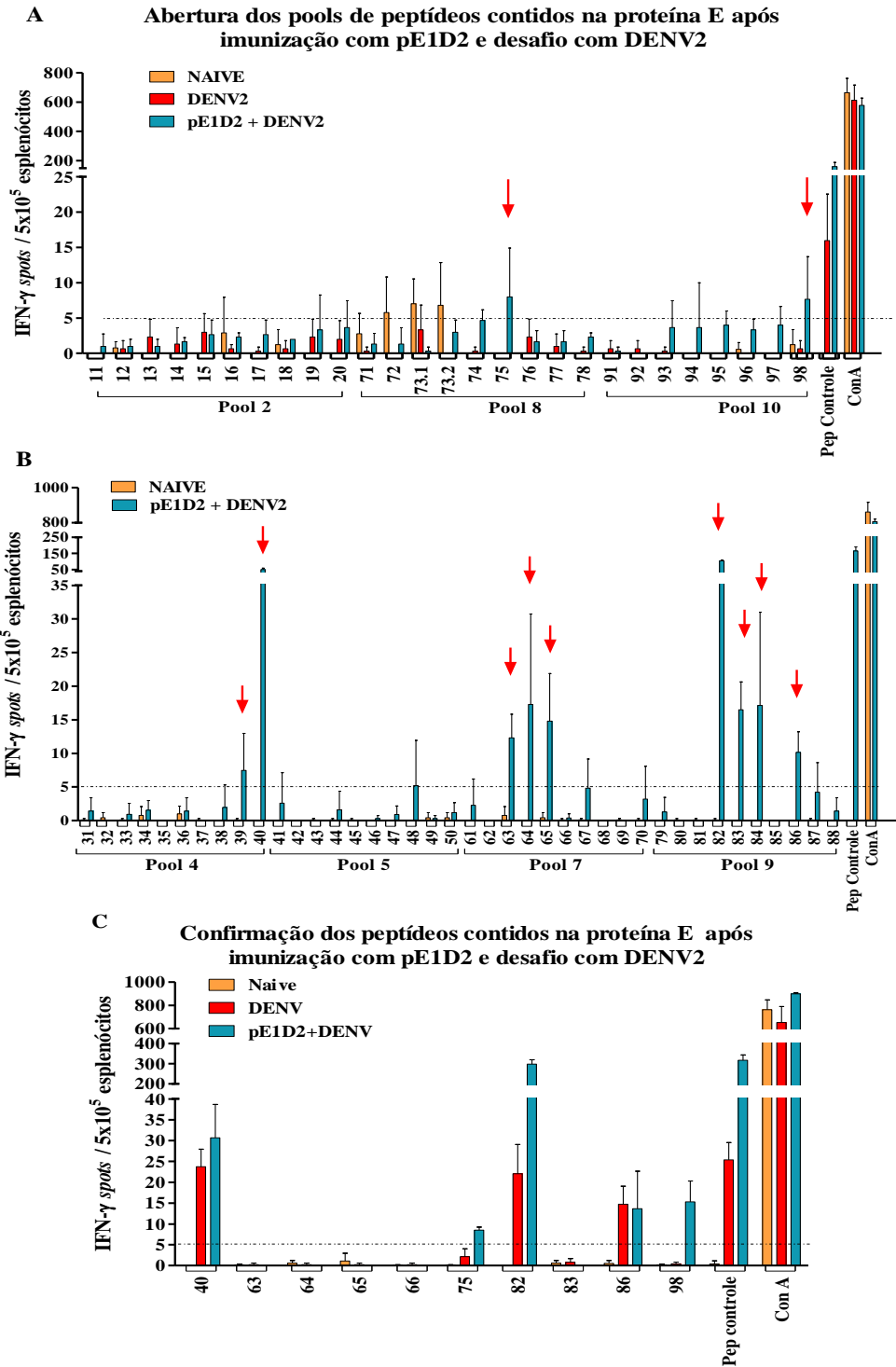


Figura 4.9: Identificação (A-B) e confirmação (C) de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E após abertura dos pools 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A produção de IFN- γ induzida pela imunização com vacina de DNA pE1D2 e desafio com DENV2 foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de DENV2, agrupados em pools, com peptídeo controle $^{331}\text{SPCKIPFEI}^{339}$, ou com concanavalina A (ConA) como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . As barras representam as médias dos valores obtidos com o desvio padrão. As setas vermelhas (A-B) indicam peptídeos selecionados para ensaio de ELISPOT confirmatório. A linha pontilhada indica o valor de corte (spots >5) assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos.

4.1.2.2. Compilação dos dados da resposta imune celular mediada pela vacina pE1D2

Os resultados referentes à identificação dos peptídeos contidos na proteína E que estimulam a produção de IFN- γ nos diferentes grupos experimentais foram resumidos na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Lista de peptídeos imunogênicos envolvidos na resposta imune celular mediada pela vacina de DNA pE1D2 e identificados a partir de uma biblioteca de peptídeos sintéticos contidos na proteína E de DENV2.

Grupos de camundongos inoculados com:	Peptídeos imunogênicos	
	Abertura de pools	Análise confirmatória
pE1D2	40, 71, 75, 82 e 83	40, 71, 75, 82 e 83
pE1D2+DENV	39, 40, 63, 64, 65, 75, 82, 83, 84, 86, 98	40, 75, 82, 86, 98
DENV	Não avaliado	

Os peptídeos 39 e 84 ainda não foram avaliados em ensaio confirmatório de ELISPOT.

Estes resultados reforçam a participação dos peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83, previamente identificados (Figura 4.9), na modulação da resposta imune celular induzida com a vacina de DNA pE1D2, assim como revela outros epítomos antigênicos (86 e 98) envolvidos nesta resposta durante infecção com DENV2.

4.1.2.3. Localização dos peptídeos identificados na estrutura da proteína E

Através de uma análise computacional, os peptídeos imunogênicos previamente identificados foram localizados na estrutura dimérica da proteína E de DENV2. A maioria dos peptídeos se localiza no DIII, com exceção dos peptídeos 40 e 71 que estão localizados no DI da proteína E.

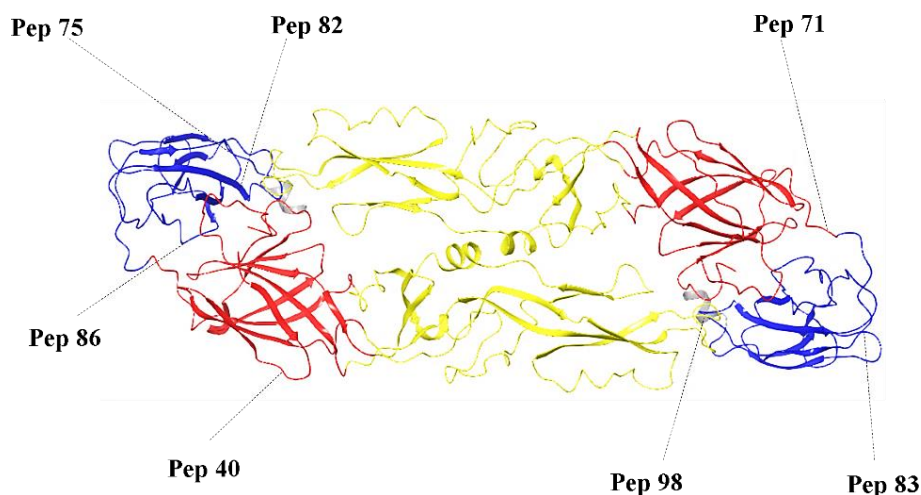


Figura 4.10: Localização dos peptídeos 40, 71, 75, 82, 83, 86 e 98 na estrutura dimérica do ectodomínio da proteína E. Os peptídeos acima se mostraram imunogênicos nos ensaios de ELISPOT com produção de IFN- γ e foram localizados na estrutura do ectodomínio da proteína E utilizando a interface Maestro 11.1 do software Schrödinger 2017-1. Os domínios I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. As regiões de haste e âncora não foram representadas.

4.2. Vacina de DNA baseada nos domínios I e II (pE3D2)

Diante dos resultados obtidos com a vacina de DNA pE1D2, que sugerem um papel importante dos domínios I e II da proteína E na produção de anticorpos neutralizantes e conseqüentemente na proteção contra DENV, foi construída uma nova vacina de DNA, pE3D2, que contém somente as seqüências que codificam estes dois domínios.

4.2.1. Construção e avaliação da integridade da vacina de pE3D2

A seqüência que codifica os domínios I e II da proteína E de DENV2, cepa Nova Guiné, foi selecionada através de uma análise bioinformática no banco de dados GenBank. O gene sintético que codifica o DI/II da proteína E foi produzido pela empresa GenScript e clonado no plasmídeo pcTPA. O plasmídeo recombinante foi denominado pE3D2 (Figura 3.2, página 31).

Após a purificação, o plasmídeo pE3D2 foi avaliado quanto à sua integridade e pureza por digestão com as enzimas de restrição *EcoR* V e *Xho* I, que flanqueiam o gene que codifica a proteína recombinante DI/II. Como controle, o plasmídeo pcTPA foi digerido com as mesmas enzimas. A digestão do plasmídeo pE3D2 com as enzimas de restrição liberou um fragmento de peso molecular esperado (0,9 Kb). A digestão do

pcTPA linearizou o plasmídeo e produziu somente uma banda (5,4 Kb) (Figura 4.11). Sendo assim, após a análise da eletroforese, somado ao sequenciamento do fragmento D1/II inserido no pcTPA, concluímos que esta amostra do plasmídeo pE3D2 estava íntegra e com o fragmento correto.

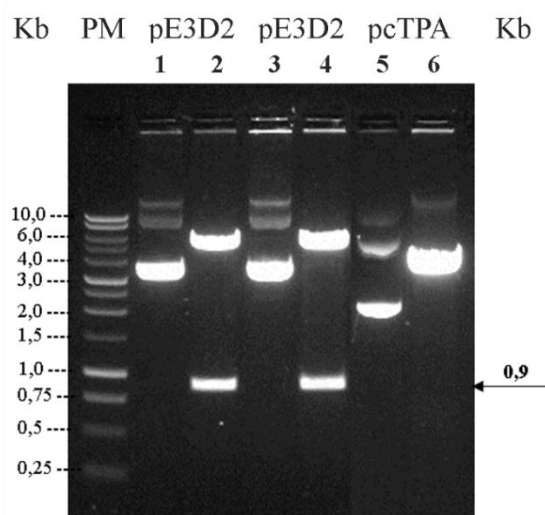


Figura 4.11: Eletroforese em gel de agarose da digestão de dois clones de pE3D2 e do controle pcTPA com as enzimas de restrição *EcoR V* e *Xho I*. Linha 1-pE3D2 (Clone 1) não digerido; Linha 2-pE3D2 (Clone 1) digerido; Linha 3-pE3D2 (Clone 2) não digerido; Linha 4-pE3D2 (Clone 2) digerido; Linha 5-pcTPA não digerido; Linha 6-pcTPA digerido; PM – peso molecular Promega 1Kb DNA.

4.2.2. Análise da resposta de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pE3D2

Amostras de soro imune coletadas 4 semanas após a imunização com a vacina de DNA pE3D2 foram avaliadas por ELISA afim de quantificar os títulos de anticorpos específicos contra o ectodomínio (DI/II/III) da proteína E. Como controle do ensaio de ELISA, foi utilizado soro pE1D2 cujo perfil de resposta de anticorpos já é conhecido.

Foram detectados anticorpos específicos contra proteína E no soro dos camundongos imunizados com o plasmídeo pE3D2 (título=1365), confirmando a expressão e ativação da resposta imune humoral mediada por esta vacina de DNA (Figura 4.12).

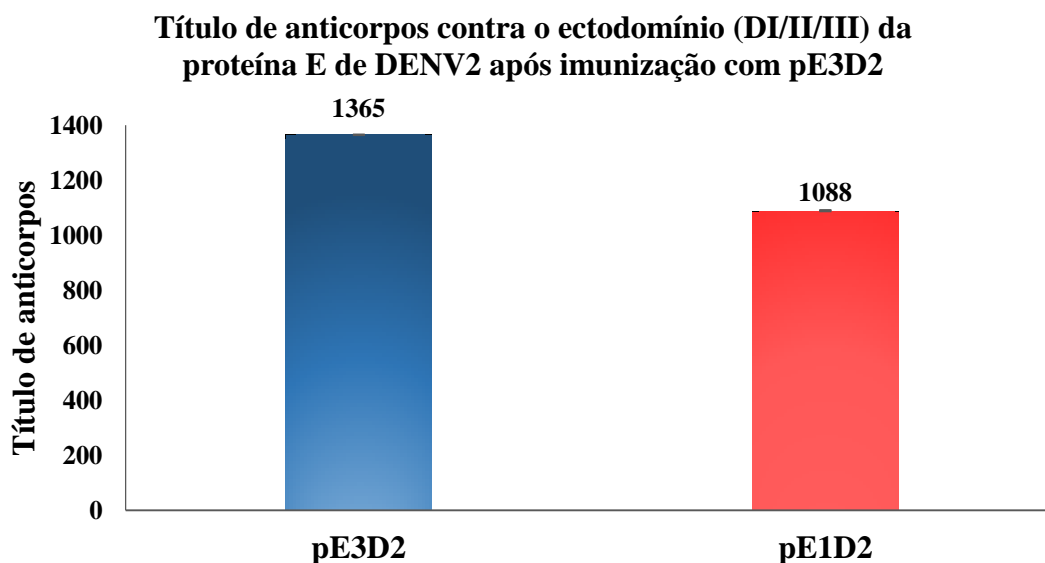


Figura 4.12: Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com a vacina de DNA pE3D2. Titulação por ELISA dos anticorpos contra o ectodomínio da proteína E de DENV2 no soro dos camundongos (n=5) coletado 4 semanas após o inóculo com o plasmídeo pE3D2. Os soros foram agrupados em um pool. As amostras foram testadas em duplicata nas placas de ELISA e o resultado foi representado através da média dos valores obtidos. As barras representam os desvios padrão.

Os anticorpos produzidos após imunização com pE3D2 também foram avaliados quanto a atividade neutralizante em um ensaio preliminar de PRNT. Entretanto, não foram observados títulos detectáveis de AcN através do ensaio de soroneutralização. Novos estudos deverão ser realizados com o soro obtido de novas imunizações.

4.2.3. Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com pE3D2 e desafiados com DENV2 por via intracerebral

Grupos de camundongos BALB/c (n = 10) foram imunizados com duas doses do plasmídeo pE3D2, com o controle negativo pcTPA ou nenhum plasmídeo e desafiados por via intracerebral com DENV2 neuroadaptado. Estes animais foram acompanhados durante 21 dias quanto aos parâmetros de morbidade e mortalidade.

A imunização com o plasmídeo pE3D2 conferiu proteção parcial contra o desafio letal com DENV2, evidenciado pelo percentual de 70% de sobrevivência dos animais deste grupo. Conforme esperado, a taxa de sobrevivência observada no grupo de animais inoculados com o controle pcTPA (20%) foi similar ao grupo de camundongos não imunizados e apenas desafiados com DENV2 (12,5%) (Figura 4.13A). Estes dados confirmam a eficiência da letalidade do desafio realizado. Quanto à morbidade, 50%

dos animais inoculados com pE3D2 apresentaram sinais clínicos variados da infecção, sendo que três destes animais foram a óbito (grau 4) (Figura 4.13B-C). Em relação aos grupos de animais imunizados com pcTPA ou apenas desafiados com DENV2, todos os camundongos apresentaram algum sinal clínico da infecção. Até o 12º dia após o desafio com DENV2, 80% dos animais inoculados com pcTPA e 90% dos animais não imunizados atingiram grau máximo de morbidade (Figura 4.13B-C). Não houve diferença estatística entre os animais inoculados com pcTPA e apenas desafiados. Embora a morbidade observada nos animais inoculados com pE3D2 (50%) não seja desprezível, há diferença estatística entre percentagem de morbidade e graus de sinais clínicos deste grupo em relação aos grupos de animais inoculados com o controle negativo pcTPA ou apenas desafiados.

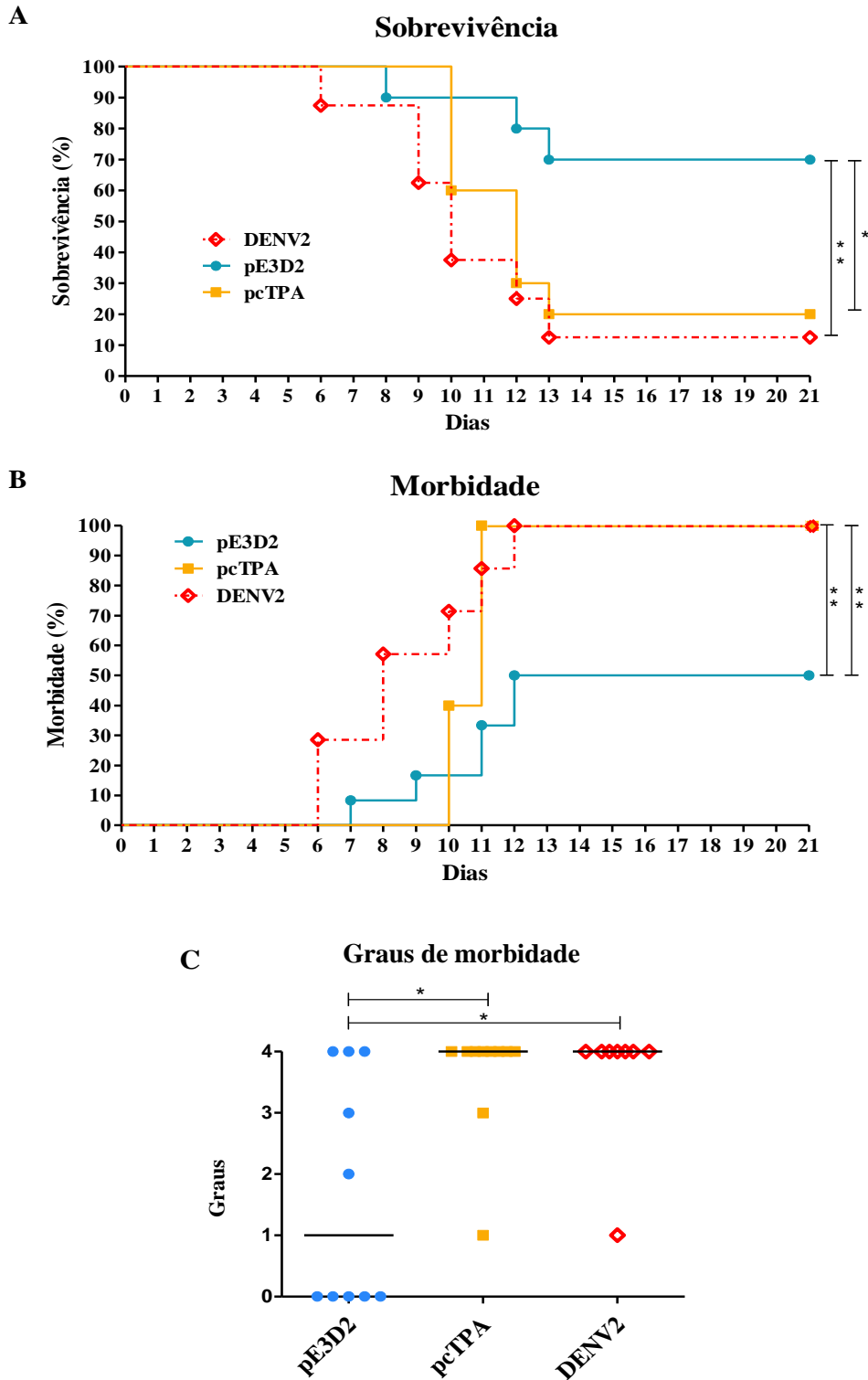


Figura 4.13: Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pE3D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado. Os animais foram acompanhados durante 21 dias quanto aos percentuais de sobrevivência (A) e morbidade (B), e graus de morbidade (C). Uma análise semi-quantitativa dos sinais clínicos apresentados foi feita utilizando graus de morbidade em uma escala de 0 a 4: 0 – ausência de sinal clínico; 1 – paralisia em uma das patas ou alteração na coluna vertebral; 2 – paralisia em duas patas ou paralisia em uma das patas e alteração na coluna vertebral; 3 - paralisia em duas patas e alteração na coluna vertebral; 4 – morte. A barra representa a mediana. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3. Vacina de DNA contendo simultaneamente os genes E e NS1 de DENV2

Além das vacinas de DNA baseadas somente na proteína E, também testamos uma vacina contendo os genes E e NS1 em um mesmo plasmídeo, pNS1/E/D2. Este plasmídeo foi construído anteriormente e contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E sob o controle do promotor derivado do CMV e a sequência que codifica a NS1 sob o controle do promotor do SV40 (Figura 3.1)

4.3.1. Expressão *in vitro* das proteínas recombinantes E e NS1 mediada pelo plasmídeo pNS1/E/D2

Com o objetivo de avaliar a expressão concomitante das proteínas E e NS1 em uma mesma célula mediada pelo plasmídeo pNS1/E/D2, células BHK-21 foram transfectadas com diferentes clones deste plasmídeo (clones 1, 2, 3, 4 e 5), assim como com os controles, pcTPANS1, pE1D2 ou pcTPA. A proteína E foi detectada com anticorpo específico 3H5 (monoclonal anti-DIII da proteína E) produzido em camundongo seguido da incubação com anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa 546 (vermelho). A proteína NS1 foi detectada com soro policlonal anti-NS1 produzido em coelho seguido da incubação com anti-IgG de coelho conjugado à Alexa 488 (verde). A utilização de anticorpos secundários conjugados a fluoróforos que emitem sinal em comprimentos de onda diferentes permitiu a dupla marcação das proteínas recombinantes e, conseqüentemente, a colocação de sítios de expressão destas proteínas nas células transfectadas.

Como podemos observar abaixo, todos os clones do plasmídeo pNS1/E/D2 mediaram a expressão das duas proteínas recombinantes E e NS1 (Figura 4.14). Através da sobreposição das imagens de fluorescência, foram identificadas células expressando cada uma das proteínas separadamente, assim como concomitantemente. Visivelmente, o nível de expressão da proteína NS1 foi mais baixo do que o observado para proteína E.

Aparentemente, um número maior de células foi transfectado com os plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2, quando comparadas às células transfectadas com os clones de pNS1/E/D2. Como esperado, não observamos positividade nas células transfectadas com o controle negativo pcTPA (Figura 4.14).

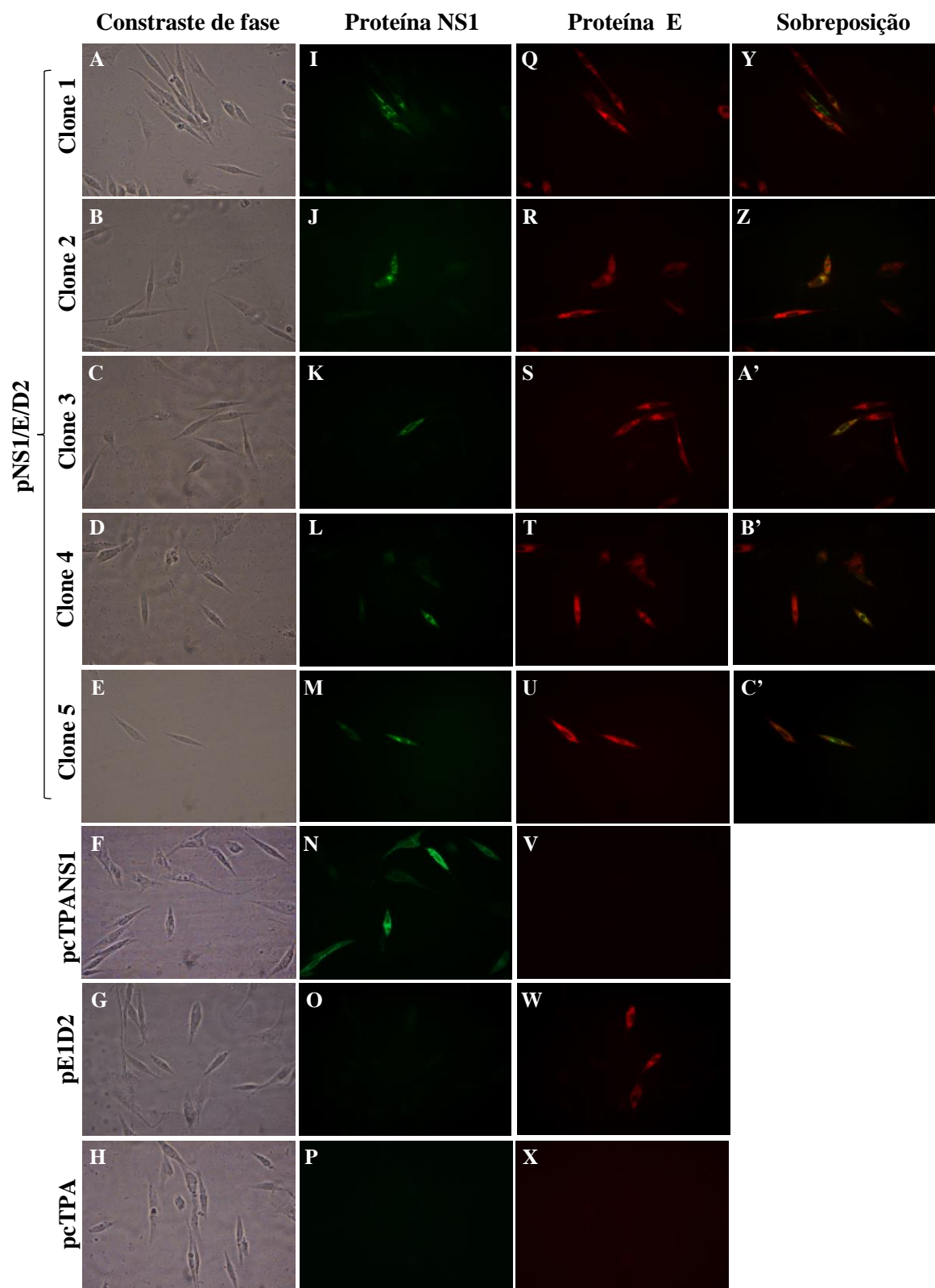


Figura 4.14: Detecção das proteínas E e NS1 em células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pNS1/E/D2 e seus controles. Células BHK-21 transfectadas com os clones 1, 2, 3, 4 ou 5 do plasmídeo recombinante pNS1/E/D2, com os controles positivos pcTPANS1 e pE1D2 ou com controle negativo pcTPA. Constraste de fase (A-H). Células incubadas com anticorpos anti-NS1 (I-P) e anti-domínio III da proteína E (Q-X). Sobreposição das imagens (Y-C'). Aumento de 40x.

4.3.2. Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com pNS1/E/D2 e desafiados por via intracerebral

Grupos de camundongos BALB/c (n = 8) foram inoculados com duas doses dos seguintes plasmídeos: pNS1/E/D2 (clones 1, 2, 3, 4, 5), pE1D2, pcTPANS1, uma mistura dos plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2 (50µg ou 100µg de cada DNA). Após imunização, estes animais foram desafiados por via intracerebral com DENV2 neuroadaptado e acompanhados durante 21 dias quanto aos parâmetros de morbidade e mortalidade. Outro grupo de camundongos não imunizados também foi desafiado com DENV2 e utilizado como controle da infecção.

Todos os clones do plasmídeo pNS1/E/D2 foram capazes de induzir proteção contra o desafio letal com DENV2. Todos os animais imunizados com os clones 1, 3 e 5 sobreviveram ao desafio, enquanto que nos grupos inoculados com os clones 2 e 4 a taxa de sobrevivência foi de 87,5% (Figura 4.15A). A imunização com a mistura dos plasmídeos pcTPANS1 + pE1D2 em ambas as concentrações testadas (50 µg ou 100µg), assim como somente com o pE1D2, foram capazes de gerar 100% de sobrevivência, ao passo que 75% dos animais imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 sobreviveram ao desafio. Em termos de sobrevivência, não houve diferença estatística entre os animais imunizados com as vacinas de DNA. Por outro lado, 90% dos animais não imunizados morreram até 13º dia após o desafio com DENV2, o que confirmou a eficiência do desafio realizado (Figura 4.15A).

A imunização com os clones do pNS1/E/D2 gerou níveis variáveis de morbidade. Tanto os animais vacinados com os clones 1 e 5 do plasmídeo pNS1/E/D2 quanto os animais que receberam a mistura dos plasmídeos pcTPANS1 + pE1D2, nas duas concentrações testadas, não apresentaram sinais clínicos da infecção (Figura 15A). Somente 12,5% dos animais imunizados com o 4, assim como com o plasmídeo pE1D2, apresentaram algum sinal clínico da infecção ao final do experimento, enquanto a morbidade do grupo de animais inoculados com o clone 2 foi de 25% e do grupo inoculado com pcTPANS1 atingiu 50%, com graus variáveis entre os grupos. Por outro lado, 87,5% dos animais apenas desafiados com DENV2 atingiram grau máximo (grau=4) de morbidade a partir do 13º dia pós infecção (Figuras 4.15B-C). Não houve diferença significativa entre os graus de morbidade apresentados pelos grupos de animais imunizados (Figura 4.15C).

Estes dados revelam que a imunização com os clones 1 ou 5 do plasmídeo pNS1/E/D2, assim como com a mistura dos plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2, gerou 100% de proteção nos camundongos desafiados com DENV2 (100% de sobrevivência e 0% de morbidade).

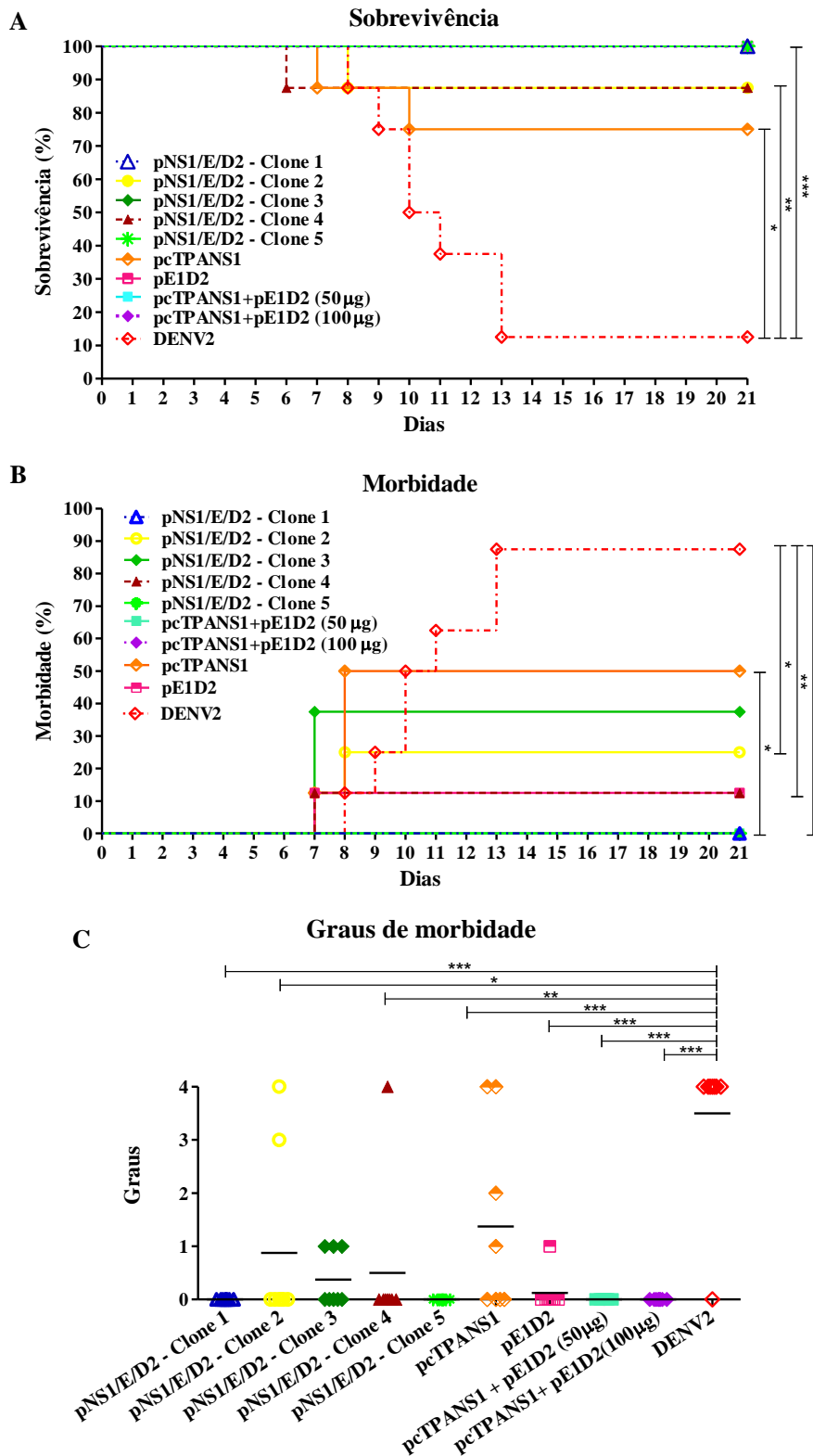


Figura 4.15: Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado. Os animais foram acompanhados durante 21 dias quanto aos percentuais de sobrevivência (A) e morbidade (B), e graus de morbidade (C). Uma análise semi-quantitativa dos sinais clínicos apresentados foi feita utilizando graus de morbidade em uma escala de 0 a 4: 0 – ausência de sinal clínico; 1 – paralisia em uma das patas ou alteração na coluna vertebral, 2 – paralisia em duas patas ou paralisia em uma das patas e alteração na coluna vertebral; 3 – paralisia em duas patas e alteração na coluna vertebral; 4 – morte. A barra representa a mediana. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Diante destes resultados, o clone 5 foi escolhido para darmos continuidade ao estudo da vacina de DNA pNS1/E/D2. Este clone foi utilizado em um segundo experimento *in vivo* afim de confirmar não apenas a proteção contra o desafio letal com DENV2, mas também a imunogenicidade gerada após imunização com o plasmídeo pNS1/E/D2.

4.3.2.1. Novo teste de proteção e desafio em camundongos BALB/c imunizados com o clone 5 do plasmídeo pNS1/E/D2

Camundongos BALB/c (n = 10 ou 5) foram inoculados com duas doses dos seguintes plasmídeos: pNS1/E/D2 (clone 5), pE1D2, pcTPANS1, uma mistura dos plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2 (100 µg de cada DNA). Outro grupo não recebeu nenhum plasmídeo. Posteriormente, os animais foram desafiados por via intracerebral com DENV2 neuroadaptado e acompanhados durante 21 dias quanto aos parâmetros de morbidade e mortalidade.

Neste novo ensaio, 100% dos animais imunizados com o clone 5 do pNS1/E/D2 sobreviveram ao desafio, confirmando os resultados anteriores. A imunização com a vacina pE1D2 bem como com a mistura pE1D2 + pcTPANS1 também gerou 100% de sobrevivência. Quanto à imunização somente com pcTPANS1, a taxa de sobrevivência foi de 80%. Em contraste, 40% dos animais não imunizados sobreviveram ao desafio (Figura 4.16A).

Em relação a morbidade, 10% dos animais imunizados com o clone 5 do pNS1/E/D2 ou pE1D2 apresentou grau 2 na escala de graus de sinais clínicos da infecção. Todos os camundongos não imunizados e apenas desafiados com DENV2 exibiram morbidade a partir do 15º dia de acompanhamento. Em termos comparativos, a morbidade (percentagem e graus de sinais clínicos) dos animais inoculados com pNS1/E/D2 foi significativamente menor quando comparado ao que foi observado no grupo de camundongos apenas desafiados. No que diz respeito a imunização com pcTPANS1, 40% dos camundongos apresentaram sinais clínicos da infecção com graus de morbidade variáveis (Figuras 4.16B-C).

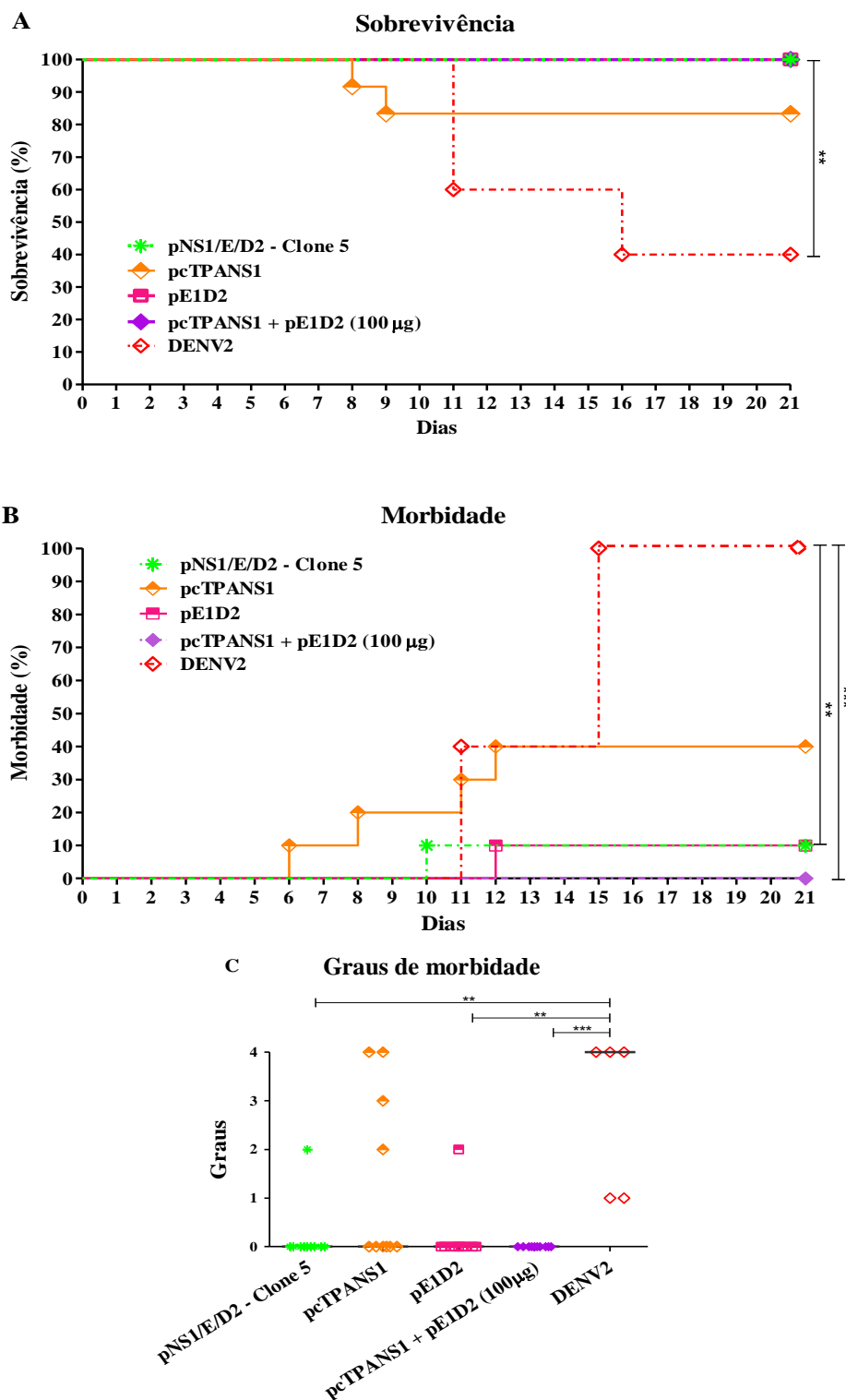


Figura 4.16: Proteção gerada em camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 após desafio letal com DENV2 neuroadaptado. Os animais foram acompanhados durante 21 dias quanto aos percentuais de sobrevivência (A) e morbidade (B), e graus de morbidade (C). Uma análise semi-quantitativa dos sinais clínicos apresentados foi feita utilizando graus de morbidade em uma escala de 0 a 4: 0 – ausência de sinal clínico; 1 – paralisia em uma das patas ou alteração na coluna vertebral; 2 – paralisia em duas patas ou paralisia em uma das patas e alteração na coluna vertebral; 3 - paralisia em duas patas e alteração na coluna vertebral; 4 – morte. A barra representa a mediana. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3.3. Análise de resposta de anticorpos contra as proteínas E e NS1 nos camundongos imunizados com pNS1/E/D2

A resposta imune humoral foi avaliada por ELISA com objetivo de quantificar os títulos de anticorpos contra as proteínas E (DIII) e NS1 nos soros imunes coletados quatro semanas após a primeira dose das vacinas de DNA.

O plasmídeo pNS1/E/D2 induziu níveis de anticorpos anti-DIII semelhantes aos observados no soro dos animais imunizados com pE1D2 (Figura 4.17A). Por outro lado, os títulos de anticorpos anti-DIII no soro dos animais que receberam a mistura de plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2 (50µg) foram aparentemente mais altos do que os observados nos animais imunizados com os clones de pNS1/E/D2 (Figura 4.17A).

Quando avaliamos a resposta imune humoral gerada contra a proteína NS1, não foram detectados níveis significativos de anticorpos anti-NS1 nos animais imunizados com o plasmídeo pNS1/E/D2. Os títulos detectados de anticorpos anti-NS1 foram similares aos observados nos animais inoculados com o controle negativo pcTPA. Por outro lado, o pcTPANS1 inoculado isoladamente ou em combinação com o pE1D2 induziu títulos altos de IgG específicos (títulos entre 30.000 e 35.000) (Figura 4.17B).

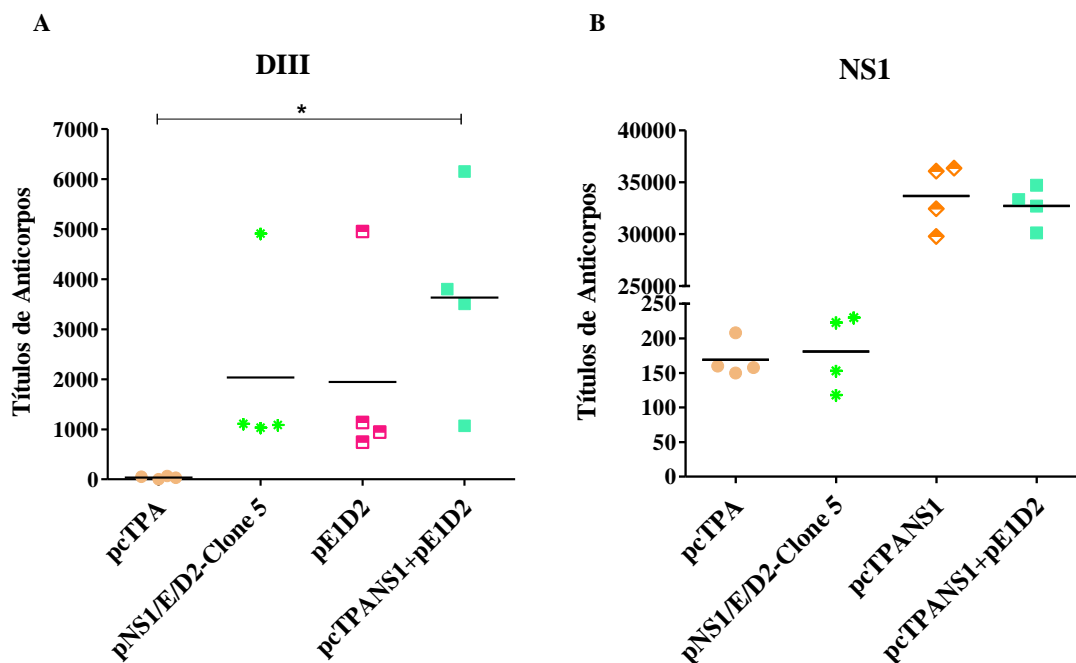


Figura 4.17: Resposta de anticorpos no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA antes do desafio com DENV2. Titulação de anticorpos contra o DIII da proteína E (A) ou contra a proteína NS1 (B) no soro de camundongos (n=4) imunizados com o plasmídeo pNS1/E/D2 (clone 5), pcTPANS1, pE1D2 e as misturas dos dois plasmídeos: pE1D2 + pcPANS1 (50µg). As amostras de soro de cada animal foram testadas individualmente em duplicatas e cada barra representa a mediana dos valores obtidos. O asterisco indica diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais usando o teste de Kruskal Wallis (*p<0,05)

4.3.3.1. Análise de resposta de anticorpos neutralizantes presentes no soro dos camundongos imunizados com pNS1/E/D2

A resposta imune humoral também foi avaliada quanto à presença de anticorpos neutralizantes no soro dos camundongos imunizados com as vacinas de DNA. As amostras de soro imune coletadas 4 semanas após a primeira dose de DNA foram testadas em ensaios de redução de placa (PRNT) utilizando DENV2.

A imunização com as vacinas de DNA pNS1/E/D2 (clone 5) e pE1D2 administrada isoladamente ou em conjunto com pcTPANS1 induziu a produção de anticorpos com atividade neutralizante. Os títulos destes anticorpos foram semelhantes entre os grupos de animais inoculados com pNS1/E/D2 (mediana=36) e pE1D2+pcTPANS1 (mediana=37) e ligeiramente mais altos no grupo de animais imunizados com pE1D2 (mediana=46) (Figura 4.18). Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Os soros dos animais imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 não foram avaliados já que o gene NS1 codifica uma proteína não estrutural que não está envolvida com a entrada do vírus na célula hospedeira e, portanto, não envolvida na indução de anticorpos neutralizantes.

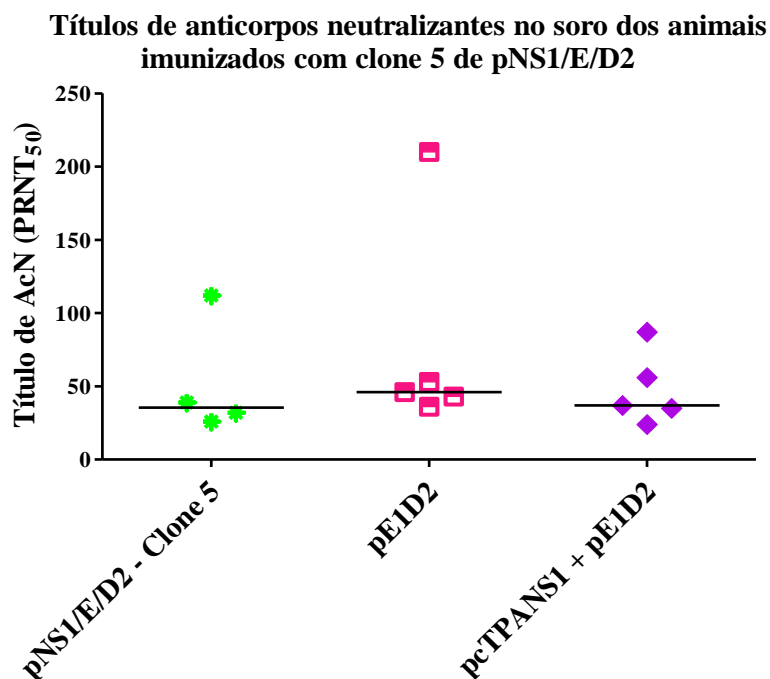


Figura 4.18: Resposta de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA. Titulação de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos (n=4) imunizados com os clones do plasmídeo pNS1/E/D2 (clone 5), pE1D2 e as misturas dos dois plasmídeos: pE1D2 + pcPANS1 (50µg). As amostras de soro de cada animal foram testadas individualmente em duplicatas e cada barra representa a mediana dos valores obtidos. Ensaio de PRNT realizado com DENV2 e monocamadas de células Vero. Não há diferença estatística entre os grupos usando o teste de Kruskal Wallis.

4.3.4. Avaliação da resposta imune celular dos camundongos imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ

Com o objetivo de avaliar a resposta imune celular especificamente quanto à presença de células secretoras de IFN- γ , esplenócitos isolados de camundongos imunizados com as vacinas de DNA pNS1/E/D2 (clone 5), pE1D2 e pcTPANS1 (administradas em conjunto ou isoladamente) ou com o controle negativo pcTPA foram incubados com os peptídeos sintéticos ³³¹SPCKIPFEI³³⁹ ou ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ contidos nas proteínas E e NS1, respectivamente, descritos na literatura como específicos para células TCD8⁺.

A resposta celular estimulada com o peptídeo sintético contido na proteína E se mostrou homogênea entre os grupos de animais vacinados. As células dos animais imunizados com o pNS1/E/D2 foram reativas aos dois peptídeos, assim como os grupos vacinados com a mistura dos plasmídeos pE1D2 + pcTPANS1 (Figura. 4.19). Detectamos um número semelhante de células produtoras de INF- γ incubadas com o peptídeo contido na proteína E ao comparar os animais inoculados com pNS1/E/D2 e pE1D2, administrado isoladamente ou em conjunto com pcTPANS1 (Figura 4.19A). Em relação ao peptídeo contido na proteína NS1, no número de células responsivas foi menor no grupo de camundongos imunizados com pNS1/E/D2 quando comparados aos que receberam o plasmídeo pcTPANS1 ou a mistura plasmideal (Figura 4.19B). Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Esplenócitos dos animais imunizados com as vacinas pcTPANS1 e pE1D2 isoladamente foram reativos aos seus peptídeos sintéticos específicos. Além disso, não houve diferença significativa na indução da resposta imune celular quando comparamos a imunização com os plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2 administradas isoladamente ou em conjunto.

Em ambos os ensaios, células dos animais inoculados com o plasmídeo controle pcTPA não foram reativas aos peptídeos sintéticos contidos nas proteínas E e NS1 (Figura 4.19A-B). Ademais, os esplenócitos isolados de todos os grupos de animais responderam ao estímulo inespecífico da concanavalina A (ConA), sem diferenças significativas entre os grupos, validando o ensaio de ELISPOT (Figura. 4.19C).

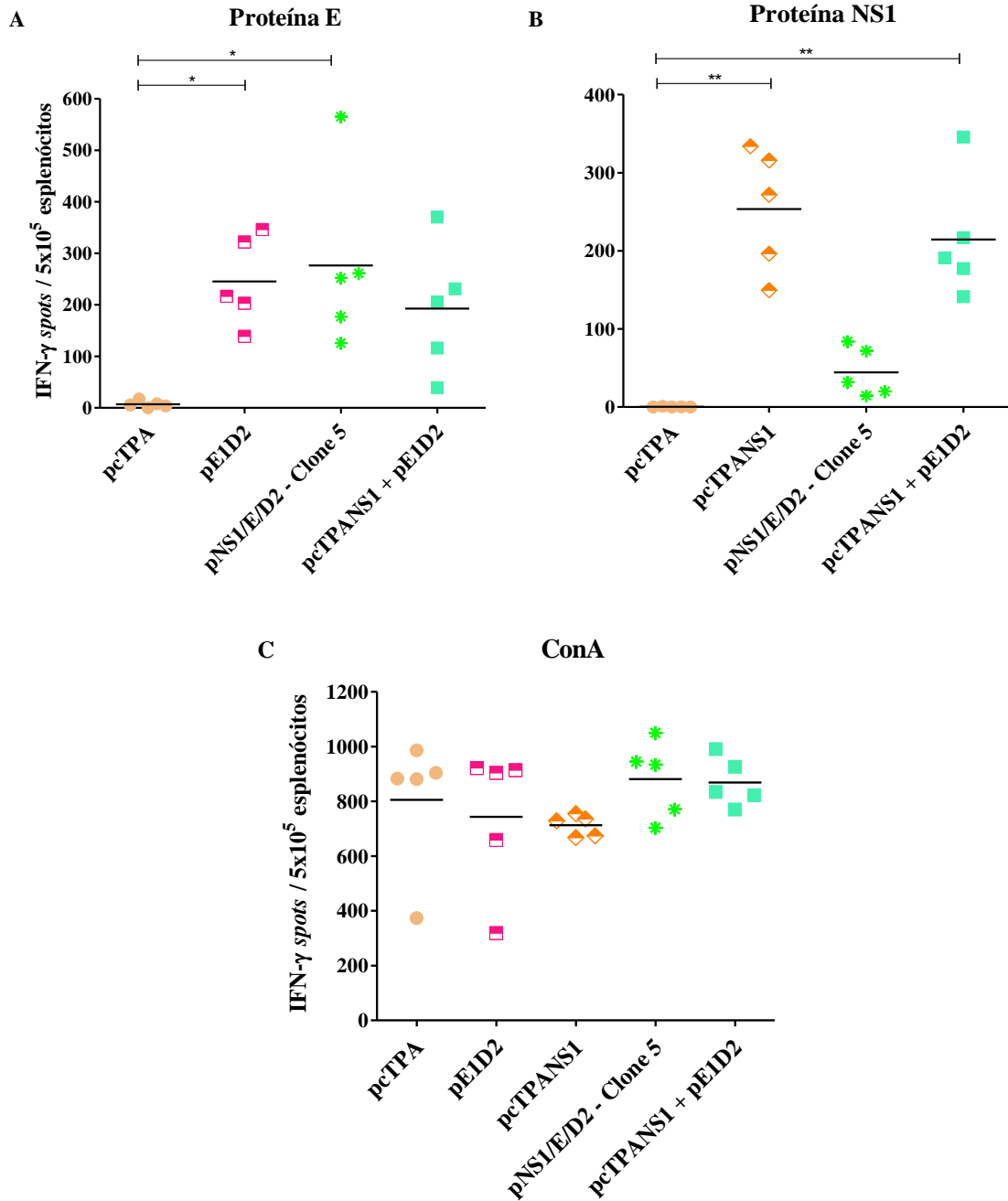


Figura 4.19: Resposta imune celular induzida pela imunização com a vacina de DNA pNS1/E/D2 através da quantificação de células produtoras de IFN- γ . A produção de IFN- γ induzida após imunização com as vacinas de DNA:pNS1/E/D2, pcTPANS1 e pE1D2 isoladamente ou em conjunto [pcTPANS1 + pE1D2 (50 μ g)]; e controle negativo pcTPA, foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com: (A) o peptídeo sintético ³³⁷SPCKIPFEI³³⁹ contido na proteína E de DENV2, (B) o peptídeo sintético ²⁶⁵AGPWHLGKL²⁷³ contido na proteína NS1 de DENV2 ou (C) com concanavalina A (ConA) como controle positivo. Os valores foram expressos em número de spots formados com secreção de IFN- γ . Asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas usando o teste de Kruskal Wallis (*p<0,05; **p<0,01).

5. Discussão

5. Discussão

A dengue é uma doença infecciosa e, atualmente, consolidada um dos principais desafios de saúde pública não só no Brasil, mas no mundo (Bhatt *et al*, 2013). Arelada a essa relevância, está a necessidade do desenvolvimento de estratégias interventoras que visem impedir a infecção viral tais como o controle da disseminação dos mosquitos vetores e abordagens vacinais (Rather *et al*, 2017). Particularmente em relação a dengue, uma candidata vacinal deve ser capaz de gerar proteção equilibrada contra os quatro sorotipos virais, uma vez que a resposta imune ineficaz contra um ou mais sorotipos constitui um possível fator de risco para o desenvolvimento das formas graves da doença em infecções futuras. As proteínas E e NS1 são indicadas como antígenos promissores para integrarem uma vacina contra o vírus Dengue. Sendo assim, vacinas de DNA baseadas nestas proteínas têm sido alvo de estudo de diversos grupos, inclusive o nosso (Kochel *et al*, 2000; Putnak *et al*, 2003; Raviprakash *et al*, 2006, 2012; Wu *et al*, 2003; Konishi *et al*, 2006 ; Costa *et al*, 2006, 2007; Azevedo *et al*, 2011; Gonçalves *et al*, 2015; Poggianella *et al*, 2015; Hurtado-Melgoza *et al*, 2016; Chen *et al*, 2016; Zheng *et al*, 2017).

5.1. Avaliação da resposta imune do plasmídeo pE1D2

A vacina de DNA desenvolvida pelo nosso grupo, pE1D2, contém o gene que codifica o ectodomínio (domínios I, II e III) da proteína E de DENV2 fusionada ao peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), que tem como função direcionar a proteína para via de secreção celular. Em camundongos BALB/c, este plasmídeo foi capaz de gerar alto nível de proteção em experimento de desafio com uma dose letal de DENV2 neuroadaptado (Azevedo *et al*, 2011). Além disso, a imunização com esta vacina induziu os dois braços da resposta imune: humoral e celular, sendo capaz de estimular a produção de anticorpos com atividade neutralizante e também ativar células T (Azevedo *et al*, 2011, 2013). Como continuidade de tais estudos, esta dissertação teve como um de seus objetivos uma análise mais detalhada da resposta imune humoral e celular induzida pela vacina de DNA pE1D2.

A proteína E desempenha várias funções biológicas (Lindbach, 2001), dentre as quais está a interação do vírus com a célula alvo. Portanto, seu potencial imunogênico envolve a indução de anticorpos neutralizantes (AcN), impedindo a entrada do vírus na

célula hospedeira (Chang *et al*, 2001). Alguns estudos em modelo murino apontam o domínio III da proteína E (DIII) como principal alvo de anticorpos neutralizantes, uma vez que esta porção apresenta os epítomos responsáveis por interagir com receptores na superfície das células alvo, mediando a endocitose da partícula viral (Modis *et al*, 2005). No entanto, mais recentemente, tem-se discutido muito sobre o potencial dos outros domínios (I e II) em estimular a produção de anticorpos neutralizantes (Widman *et al*, 2015). Soros de indivíduos infectados pelo vírus da dengue apresentaram níveis mais baixos de anticorpos específicos contra o DIII. Além disso, a atividade neutralizante de tais soros não foi afetada após depleção de tais anticorpos (de Alwis *et al*, 2012; Wahala *et al* 2009, 2012; Williams *et al* 2012). Desta forma, há necessidade de mais estudos para compreender melhor o papel dos diferentes domínios da proteína E na indução da resposta imune humoral protetora contra o vírus da dengue.

Sendo assim, amostras de soro de camundongos imunizados com pE1D2 foram aplicadas à coluna cromatográfica HiTrap SP HP tratada com a proteína DIII, para a depleção de anticorpos anti-DIII, e a capacidade neutralizante destas amostras foi avaliada em cultura de células. Nossos estudos, realizados em dois experimentos independentes, mostraram que a fração de soro enriquecida de anticorpos anti-DI/II, apresentou atividade neutralizante, indicando que os anticorpos gerados com a vacina pE1D2 direcionados contra estes dois domínios são capazes de neutralizar a infecção com DENV2. Este resultado corrobora com os estudos citados acima (de Alwis *et al*, 2012; Wahala *et al* 2009, 2012; Williams *et al* 2012). Além disso, outros trabalhos já relataram a presença de anticorpos neutralizantes direcionados contra o DI/II da proteína E em soro de indivíduos infectados com outros flavivírus, como vírus do oeste do Nilo (Olhphant *et al*, 2006; Kaufman *et al*, 2010). Ademais, o nosso grupo também produziu anteriormente uma vacina de DNA que contém somente a sequência que codifica o DIII da proteína E de DENV2, denominada pE2D2. Esta vacina induziu baixos níveis de anticorpos neutralizantes quando comparada ao plasmídeo pE1D2, sugerindo a participação dos outros domínios na produção de anticorpos neutralizantes no (Azevedo *et al*, 2011).

Por outro lado, observamos que a fração enriquecida de anticorpos anti-DI/II apresentou títulos mais elevados de soroneutralização quando comparada ao soro inicial, com anticorpos anti-DI/II e anti-DIII (antes da depleção DIII). Tais resultados foram surpreendentes pois sugerem, pelo menos no que diz respeito à resposta gerada com a vacina pE1D2, que anticorpos anti-DIII não só não são tão neutralizantes quanto

os anticorpos anti-DI/II, mas também impedem de algum modo a neutralização destes últimos. Trabalhos mais recentes vêm mostrando a relevância de epítomos conformacionais dos domínios I/II apenas presentes na partícula viral nativa na atividade neutralizante (de Alwis *et al*, 2012; Fibriansah *et al*, 2015; Dejnirattisai *et al*, 2015). Uma das vantagens da vacina de DNA é a expressão endógena do antígeno, propiciando um processamento proteico mais fiel e comparável ao ocorrido durante a infecção natural pelo patógeno. Sendo assim, é possível que a expressão da proteína E mediada pelo plasmídeo pE1D2 resulte em uma conformação proteica mais conservada e, portanto, exponha epítomos antigênicos comuns aos observados durante a infecção pelo DENV, os quais podem constituir maior importância na neutralização viral.

Em contrapartida, mais recentemente Montéz-Gomez e colaboradores mostraram que indivíduos acometidos pela FD apresentam níveis mais altos de anticorpos direcionados ao DI/II em comparação aos indivíduos que manifestaram a FHD, sugerindo um envolvimento destes anticorpos no bom prognóstico da doença (Montéz-Gomez *et al*, 2017). Entretanto, neste último trabalho, o número de pacientes avaliado não foi suficiente para uma análise com poder estatístico.

Uma das preocupações em relação à nossa metodologia de depleção de anticorpos anti-DIII seria a conformação da proteína DIII acoplada à coluna de afinidade. Caso esta proteína não apresentasse um estado conformacional preservado, os anticorpos anti-DIII depletados da coluna poderiam ser direcionados somente a epítomos lineares e de menor relevância para neutralização viral. Afim de refutar esta hipótese, os anticorpos produzidos após imunização com pE1D2 foram testados por ELISA utilizando o DIII recombinante íntegro ou desnaturado após exposição ao calor. Foi verificada uma queda drástica no título de anticorpos do soro pE1D2 utilizando o DIII desnaturado, indicando a presença de epítomos conformacionais na proteína DIII recombinante que são reconhecidos pelos anticorpos gerados com a vacina pE1D2. Sendo assim, a fração de soro recolhida da coluna foi depletada de anticorpos que reconhecem preferencialmente epítomos conformacionais do DIII da proteína E, o que provavelmente propicia uma comparação mais fiel dos resultados ao que ocorre na infecção natural pelo DENV.

De um modo geral, nossos resultados, assim como outros estudos, sugerem que o desenvolvimento de uma vacina baseada na indução de anticorpos com atividade neutralizante deve abranger a resposta direcionada aos epítomos imunogênicos presentes no DI/II da proteína E, e não apenas no DIII.

As vacinais em desenvolvimento mais avançado são majoritariamente baseadas nas proteínas estruturais prM e E, tendo por principal mecanismo de proteção a indução de anticorpos neutralizantes (Torresi *et al*, 2017). Entretanto, alguns trabalhos vêm demonstrando a contribuição da resposta imune celular no combate a infecção por DENV em modelo animais e humanos (Roth *et al*, 2018), inclusive relatando que existe um direcionamento desta resposta a epítomos imunogênicos na proteína E (Weiskopf *et al*, 2013; Quinan *et al*, 2014; Gil *et al*, 2017). Ademais, um dos estudos de fase clínica da vacina atualmente licenciada no Brasil, Dengvaxia, relatou que crianças imunizadas apresentaram soroconversão com atividade neutralizante contra os 4 sorotipos virais, porém não se mostraram protegidas contra DENV2 (Sabchareon *et al*, 2012), o que pode ser devido à uma baixa indução de resposta imune celular nestas crianças.

Por outro lado, as vacinas de DNA apresentam como uma de suas principais vantagens a indução dos dois braços da resposta imune, humoral e celular, incluindo a ativação de linfócitos T citotóxicos. Nesse contexto, nosso grupo demonstrou a indução da resposta imune celular mediada por plasmídeos baseados nas proteínas NS1 e NS3 (Costa *et al*, 2006; 2011; Gonçalves *et al*, 2015; Oliveira *et al*, 2016), bem como na proteína E (Azevedo *et al*, 2013). Conseqüentemente, é importante uma análise mais detalhada da resposta imune celular gerada com as nossas vacinas. Em estudos anteriores, o grupo mostrou o papel fundamental de linfócitos T CD4+ na proteção gerada com uma vacina de DNA baseada na proteína NS1, pcTPANS1 (Gonçalves *et al*, 2015). Em contrapartida, a maior parte dos estudos que existem envolvendo vacinas contra dengue e resposta imune celular é focada na ativação de células T CD8+ (Yauch *et al*, 2009; Weiskopf *et al*, 2013; Zellweger *et al*, 2015; Ngono *et al*, 2016).

Sendo assim, a resposta imune celular induzida pelo plasmídeo pE1D2 foi avaliada frente a uma biblioteca de peptídeos contidos na proteína E de DENV2 afim de identificar epítomos imunodominantes envolvidos na resposta contra o DENV em modelo murino. A resposta foi avaliada através da quantificação da produção de IFN- γ por ensaios de ELISPOT. Esta citocina tem sido descrita como um mediador da resposta imune celular, desempenhando um papel importante na atividade anti-viral contra DENV (Shresta, *et al*, 2004).

Identificamos 5 peptídeos imunogênicos (peptídeos 40, 71, 75, 82 e 83) nos animais somente vacinados e outros 2 nos animais vacinados e desafiados com DENV2 (peptídeos 86 e 98), os quais induziram a produção de IFN- γ em níveis variáveis. Em uma análise preliminar da localização dos peptídeos identificados na estrutura

secundária da proteína E, observamos que os epítomos 40 e 71 se localizam no domínio I, enquanto os outros epítomos estão presentes no DIII da proteína E (Figura.5.1).

A biblioteca de peptídeos analisados neste trabalho é composta por peptídeos com 15 aminoácidos cada. Epítomos deste tamanho podem ser apresentados via MHC de classe I e II e, conseqüentemente, ativar ambos fenótipos TCD4⁺ e TCD8⁺ (Rivino *et al*, 2013), o que nos permitirá posteriormente caracterizar melhor as subpopulações celulares em um mesmo ensaio. Vale ressaltar que os peptídeos 82 e 83 englobam a sequência do peptídeo controle ³³¹SPCKIPFEI³³⁹, utilizado nos nossos ensaios de ELISPOT e previamente descrito na literatura como específico para células TCD8⁺ (Rothman, 1996). É possível que peptídeos mais extensos, mas que contenham similaridade com o peptídeo controle, estejam também ativando células TCD4⁺.

Para a continuação deste trabalho, serão necessários estudos mais aprofundados para caracterizar a funcionalidade da resposta celular frente a estes peptídeos, avaliar o perfil destas células e a produção de outras citocinas. Além disso, tais peptídeos serão fundamentais para podermos avaliar a importância da ativação celular na proteção conferida pela vacina pE1D2.

5.2. Avaliação da resposta imune do plasmídeo pE3D2

Tendo em vista os resultados que obtivemos a vacina pE1D2 e os estudos de soroneutralização, foi construída uma outra vacina de DNA contendo a sequência que codifica somente os domínios I e II da proteína E de DENV2, o pE3D2. Inicialmente, este plasmídeo foi purificado e a integridade do DNA plasmideal foi confirmada por digestão com enzimas de restrição específicas. O potencial imunogênico e protetor desta vacina de DNA foi avaliado em ensaios pré-clínicos de imunização e desafio com DENV2 em camundongos BALB/c, de acordo com um protocolo previamente estabelecido pelo nosso grupo (Costa *et al*, 2006; Azevedo *et al*, 2011; Gonçalves *et al*, 2015; Oliveira *et al*, 2016).

A análise da resposta imune humoral nos animais vacinados com pE3D2 revelou que a expressão somente dos domínios I/II se mostrou imunogênica, gerando anticorpos que reconhecem o ectodomínio da proteína E. Entretanto, nossos estudos preliminares sugerem que tais anticorpos não apresentam atividade neutralizante. Uma das hipóteses reside na incerteza da conformação assumida pelos DI/II após a expressão na célula transfectada pelo plasmídeo pE3D2. Alguns trabalhos já relataram a importância de

epítomos conformacionais dos domínios I/II na indução de anticorpos neutralizantes. Estes trabalhos identificaram, em sua maioria, anticorpos direcionados à região de interface dos DI/II, somente presentes nos dímeros de proteína E (de Alwis *et al*, 2012; Fibriansah *et al*, 2015; Dejnirattisai *et al*, 2015). Sendo assim, pretendemos ainda analisar por imunofluorescência a expressão *in vitro* da proteína DI/II mediada pela transfecção de células de mamífero com o plasmídeo pE3D2, a fim de confirmar a correta expressão deste antígeno.

Apesar dos resultados negativos da resposta de anticorpos neutralizantes induzidos pelo plasmídeo pE3D2, tal vacina foi capaz de gerar proteção parcial em camundongos BALB/c. Após o desafio com DENV2, 70% dos animais imunizados com o pE3D2 sobreviveram à infecção. Este resultado nos leva a pensar sobre o possível envolvimento de resposta celular nesta proteção.

Rocha e colaboradores (2014) construíram uma vacina tetravalente de subunidade que consiste em peptídeos sintéticos contidos nos DI/II da proteína E. A avaliação da resposta imune em camundongos mostrou que tais peptídeos foram capazes de induzir resposta de anticorpos. Entretanto, estes anticorpos apresentaram baixa ou nenhuma atividade neutralizante em ensaios de PRNT com os diferentes sorotipos virais. Além disso, a imunização com os peptídeos foi capaz de ativar uma resposta imune celular, com produção de IFN- γ e TNF- α . Porém, a magnitude desta resposta foi maior nos animais imunizados e inoculados como DENV (Rocha *et al*, 2014). Este trabalho sustenta o envolvimento dos domínios I e II na resposta celular protetora contra DENV.

5.3. Vacina de DNA contendo simultaneamente os genes E e NS1 de DENV2

Outra construção do nosso grupo, pcTPANS1, que contém o gene inteiro da proteína NS1, se mostrou bastante protetora em ensaios de imunização e desafio em camundongos Balb/c. A imunização com o pcTPANS1 induziu altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína NS1, assim como foi capaz de ativar resposta imune celular específica contra NS1 (Costa *et al*, 2006, Costa *et al*, 2007, Gonçalves *et al*, 2015; Oliveira *et al*, 2016), ao passo que a inoculação com pE1D2 foi capaz de estimular a produção de anticorpos com atividade neutralizante e também ativar células T (Azevedo *et al*, 2011; 2013). Diante de resultados promissores com pE1D2 e

pcTPANS1, a utilização destes dois antígenos, E e NS1, em um único plasmídeo poderia constituir uma vacina mais eficaz e protetora, gerando respostas imunes que atuariam em fases distintas da infecção viral. Em um momento inicial da infecção com DENV, anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina baseada na proteína E poderiam atuar impedindo a entrada da partícula viral na célula alvo. Já a vacina baseada na NS1 geraria uma resposta imune que atuaria em um momento posterior da infecção, destruindo células que por ventura fossem infectadas e expressassem a proteína NS1 associada à membrana celular durante a replicação viral. Alguns estudos sugerem que anticorpos contra NS1 podem se ligar a esta proteína presente na superfície de células hospedeiras infectadas, levando à destruição destas células via o sistema do complemento (Schlesinger *et al*, 1987; Lin *et al*, 1998). Já o nosso grupo mostrou que, além dos anticorpos, as células T CD4⁺ são importantes para a proteção mediada pelo plasmídeo pcTPANS1 (Gonçalves *et al*, 2015). Sendo assim, um outro objetivo do presente trabalho foi a avaliação de uma vacina de DNA construída previamente pelo nosso grupo que contém ambos os genes que codificam as proteínas NS1 e E de DENV2. O plasmídeo recombinante pNS1/E/D2 contém o gene que codifica a proteína NS1 inteira e o ectodomínio (domínios I, II e III) da proteína E, ambos fusionados à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) e sob o controle regiões promotoras independentes. Inicialmente, o grupo tentou construir um plasmídeo contendo ambos os genes sob o controle do promotor derivado do CMV de modo independente, mas tal construção não foi viável, provavelmente devido a recombinações entre as sequências repetidas deste promotor. Consequentemente, foi construído o plasmídeo pNS1/E/D2 que contém o gene que codifica a proteína NS1 sob o controle do promotor do SV40 e o ectodomínio da proteína E sob o controle do promotor do CMV.

Primeiramente, foram purificados diferentes clones (clones 1, 2, 4, 5 e 6) do plasmídeo pNS1/E/D2. Os DNAs se mostraram íntegros e os fragmentos digeridos com enzimas de restrição específicas apresentaram tamanhos esperados. Ao analisarmos a expressão das proteínas E e NS1 em células de mamífero BHK-21 transfectadas com os clones do plasmídeo pNS1/E/D2, constatamos por imunofluorescência que as duas proteínas estavam sendo expressas. Entretanto, foi observado, aparentemente, um número maior de células expressando as proteínas NS1 e E isoladamente, ou seja, quando transfectadas com os plasmídeos pE1D2 e pcTPANS1, do que com o plasmídeo pNS1/E/D2, principalmente no que se refere à NS1. Uma possível explicação para este

fato está relacionada aos diferentes promotores que regulam a expressão de cada um dos genes. O promotor derivado do vírus símio 40 (SV40), que regula a expressão da NS1 no pNS1/E/D2, é mais fraco do que o promotor derivado do citomegalovírus humano (CMV), que controla a expressão da proteína E (Qin *et al*, 2010). Sendo assim, a expressão da proteína E pode estar sendo mais eficiente, gerando um maior número de cópias nas células transfectadas com o plasmídeo pNS1/E/D2. Há ainda a possibilidade da expressão de um gene interferir na expressão do outro gene. A utilização de anticorpos secundários conjugados a diferentes fluoróforos permitiu a avaliação da expressão concomitante das proteínas E e NS1. Os resultados mostraram células expressando cada uma das proteínas separadamente, assim como concomitantemente. Curiosamente, uma mesma célula transfectada com o plasmídeo pNS1/E/D2 pode ser positiva para detecção de apenas uma das proteínas recombinantes, E ou NS1, sustentando a hipótese de que a expressão de um dos genes pode inibir a expressão do outro. Entretanto, essas análises experimentais foram apenas qualitativas, sendo necessárias avaliações quantitativas futuras, com ensaios de citometria de fluxo, por exemplo, a fim de fazermos uma análise comparativa do número de células positivas transfectadas com os plasmídeos pNS1/E/D2, pcTPANS1 e pE1D2, assim como quanto à quantidade de proteínas produzidas por célula.

Uma vez confirmada a expressão de ambas as proteínas, camundongos BALB/c foram imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2, assim como com uma mistura dos plasmídeos pE1D2 + pcTPANS1 ou tais plasmídeos isoladamente. Os clones do plasmídeo pNS1/E/D2 foram capazes de induzir proteção contra o desafio letal com DENV2, porém com variações nas taxas de sobrevivência e morbidade. Neste primeiro experimento, somente os clones 1 e 5 do plasmídeo pNS1/E/D2 induziram proteção total (100% de sobrevivência e 0% de morbidade), nível semelhante ao observado nos animais inoculados com a mistura dos plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2 nas duas concentrações analisadas. Já quando inoculados separadamente, os plasmídeos controles pE1D2 e pcTPANS1 induziram níveis distintos de sobrevivência (100% e 75%, respectivamente) e morbidade (12,5% e 50%, respectivamente).

De posse destes dados, o clone 5 do pNS1/E/D2 foi escolhido para confirmação da proteção e avaliação da imunogenicidade induzida com esta vacina quanto à produção de anticorpos e ativação de células T.

A análise da resposta imune humoral através dos testes de ELISA revelou diferenças para cada uma das duas proteínas. Com relação à produção de anticorpos

anti-NS1, observamos uma resposta negativa nos soros de camundongos inoculados com o plasmídeo pNS1/E/D2, com níveis de anticorpos semelhantes aos detectados nos animais que receberam o plasmídeo controle pcTPA, sendo, portanto, considerados inespecíficos. Por outro lado, altos títulos de anticorpos anti-NS1 foram detectados no soro de animais imunizados com o pcTPANS1 em conjunto ou não com pE1D2. Conforme discutido anteriormente, aparentemente a expressão *in vitro* da proteína NS1 foi mais baixa no plasmídeo pNS1/E/D2. É provável que o nível de expressão desta proteína nos animais vacinados com o pNS1/E/D2 também tenha sido mais baixo do que nos camundongos que receberam o controle pcTPANS1.

Já quando avaliamos a resposta imune humoral gerada contra o domínio III da proteína E, o pNS1/E/D2 induziram níveis de anticorpos específicos semelhante aos observados no soro dos animais imunizados com plasmídeo controle pE1D2. Curiosamente, os títulos destes anticorpos foram aparentemente mais elevados no soro dos animais imunizados com a mistura plasmideal, sugerindo um possível efeito adjuvante da proteína NS1 na resposta mediada pela proteína E. Somado a isso, espera-se que estes anticorpos possuam a capacidade de neutralizar a partícula viral e, conseqüentemente, impedir a infecção pelo DENV. Através do ensaio de PRNT, foi possível observar a presença de anticorpos com atividade neutralizante no soro dos animais imunizados com os clones do plasmídeo pNS1/E/D2, com o pE1D2 e com as misturas dos dois plasmídeos pcTPANS1 e pE1D2. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos, não sendo, portanto, observado um efeito adjuvante da proteína NS1 quando combinada a proteína E na resposta imune celular. Contudo, esses resultados são representativos de um número pequeno de animais e, portanto, não possuem relevância estatística. Novas amostras de soro imune de camundongos inoculados com tais plasmídeos deverão ser avaliadas por ELISA e PRNT afim de investigar melhor a contribuição destas proteínas na resposta imune humoral.

Ensaio de ELISPOT foram realizados para comprovar a indução da resposta imune celular pela vacina de DNA pNS1/E/D2, utilizando peptídeos sintéticos contidos na proteína NS1 e na proteína E de DENV2, descritos previamente na literatura como específicos para células TCD8 (Rothman, 1996; Gao, 2008). Os resultados demonstraram a presença de células produzindo IFN- γ em todos os grupos de animais imunizados. Observamos que os esplenócitos isolados dos animais imunizados com a vacina de DNA pNS1/E/D2 foram reativos a ambos os peptídeos sintéticos, porém uma ativação maior destas células frente ao peptídeo contido na proteína NS1 foi observada

nos animais que foram imunizados com o plasmídeo pcTPANS1 isoladamente ou em conjunto com o pE1D2. Tais resultados sugerem que apesar da baixa expressão de NS1 mediada pelo plasmídeo pNS1/E/D2, tal expressão foi suficiente para ativar uma resposta celular, embora em menor magnitude quando comparado ao pcTPANS1.

Outros grupos também vêm trabalhando com construções baseadas nas proteínas E e NS1 do vírus Dengue. Em uma dessas abordagens, foram construídos plasmídeos contendo fragmentos dos genes que codificam a proteína NS1 e os domínios II e III da proteína E de DENV2 sob controle do promotor do citomegalovírus. Esta construção foi denominada pEII*EIII*/NS1 (Mellado-Sánchez *et al*, 2010). A proteção induzida por esta vacina foi avaliada por uma estratégia de dose/reforço no qual os plasmídeos foram inoculados em camundongos BALB/c e posteriormente receberam doses das proteínas E e NS1 purificadas. Os resultados demonstraram que estes animais produziram uma resposta humoral específica contra as duas proteínas, incluindo a produção de anticorpos neutralizantes. Entretanto, em apenas 40% dos animais imunizados com pEII*EIII*/NS1 pôde ser constatada a presença de anticorpos com atividade neutralizante. Neste trabalho, não foi avaliada a proteção *in vivo*, com desafio dos camundongos imunizados. De acordo com estes dados, nossa estratégia vacinal baseada nestes dois genes aparentemente foi mais eficaz na produção de anticorpos neutralizantes. Em outro trabalho, a construção de uma vacina de DNA foi baseada tanto nas proteínas E e NS quanto na proteína prM de DENV1. Ensaio de imunização e desafio em camundongos BALB/c utilizando DENV1 revelaram que esta vacina foi capaz de gerar resposta protetora significativa. Não só foi constatada a indução de uma resposta humoral específica, mas também um aumento da atividade de linfócitos T citotóxicos com altas concentrações de citocinas como IFN- γ e IL-2. Estes dados sugerem que esta abordagem vacinal induz tanto resposta imune humoral quanto celular assim como altos níveis de proteção, indicando a eficiência em usar os antígenos E e NS1 em uma mesma vacina. Entretanto, nestes estudos não foi avaliada a expressão das proteínas recombinantes, isoladamente, mediada pela vacina de DNA contendo os dois genes. Além disso, os autores utilizaram o vírus da dengue (que não contém a NS1, por ser uma proteína não estrutural) como antígeno nos testes para a avaliação das respostas imunes geradas com esta vacina, tornando seus dados pouco conclusivos em relação à resposta induzida pela proteína NS1 (Zheng *et al*, 2011; Lu *et al*, 2013).

Com base na nossa proposta inicial, a imunização com o pNS1/E/D2 que codifica as proteínas E e NS1 poderia conferir um nível de proteção maior em relação a

proteção induzida pelas vacinas pE1D2 e pcTPANS1. Sendo assim, foi possível demonstrar que a vacina de DNA pNS1/E/D2 gerou proteção contra a infecção pelo DENV e induziu os diferentes ramos da resposta imune: humoral e celular. Entretanto, nossa construção não foi eficaz ao expressar o antígeno NS1, muito provavelmente pela baixa eficiência do promotor oriundo do SV40.

Em termo gerais, a imunização com a mistura dos plasmídeos pE1D2 + pcTPANS1 se mostrou mais protetora no nosso modelo animal. Nossos resultados sugerem que a combinação destes dois genes é uma boa abordagem para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue. Além disso, esses dados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunogenicidade gerada por essas duas proteínas e na proteção contra dengue.

6. Conclusões

6. Conclusões

Como nesta dissertação avaliamos diferentes vacinas de DNA, as conclusões em relação a cada vacina foram organizadas em partes:

Vacina pE1D2

✓ A avaliação da resposta imune humoral induzida pela vacina pE1D2, baseada no ectodomínio da proteína E, revelou que os anticorpos direcionados contra epítomos contidos nos DI/II foram mais neutralizantes do que os que reconhecem DIII. Além disso, anticorpos anti-DIII interferiram negativamente na neutralização mediada pelos anticorpos anti-DI/II;

✓ Foram identificados 7 epítomos imunogênicos relacionados à resposta imune celular mediada pelo pE1D2 e estes epítomos foram capazes de ativar células produtoras de IFN- γ em diferentes magnitudes.

Vacina pE3D2

✓ A vacina de DNA pE3D2, baseada nos domínios I e II da proteína E, induziu a produção de anticorpos específicos contra a proteína E. Entretanto, estes anticorpos não apresentaram atividade neutralizante nos ensaios de PRNT;

✓ A imunização com pE3D2 levou a proteção parcial dos camundongos BALB/c desafiados com DENV2.

Vacina pNS1/E/D2

✓ O plasmídeo pNS1/E/D2 mediou a expressão das proteínas E e NS1 *in vitro*, em uma mesma célula. Entretanto, o nível de expressão de NS1 foi visivelmente menor, o que também deve ter ocorrido *in vivo*, comprometendo a resposta imune gerada contra esta proteína nos animais vacinados com pNS1/E/D2;

✓ A imunização com a vacina pNS1/E/D2 não induziu níveis significativos de anticorpos anti-NS1;

✓ Camundongos imunizados com a vacina pNS1/E/D2 apresentaram anticorpos específicos contra a proteína E com atividade neutralizante, em níveis semelhantes aos observados nos animais imunizados com pE1D2, bem como com a mistura plasmideal pE1D2+pcTPANS1

✓ A vacina pNS1/E/D2 induziu uma resposta imune celular direcionada à proteína E, detectada pela produção de IFN- γ . A resposta imune celular direcionada à NS1 se mostrou bem mais fraca, quando comparada à resposta observada com a imunização com a vacina pcTPANS1;

✓ A imunização com a vacina pNS1/E/D2 levou a uma proteção significativa nos animais desafiados com DENV2.

Combinação pE1D2 + pcTPANS1

✓ A imunização com a mistura dos dois plasmídeos, (pE1D2 + pcTPANS1) foi mais eficiente, tanto no que diz respeito à imunogenicidade quanto à proteção contra DENV2.

Assim, de um modo geral, a combinação dos antígenos E e NS1 (pE1D2 + pcTPANS1) foi mais eficiente em induzir proteção contra DENV2. Quanto à resposta desencadeada pelo antígeno E (pE1D2), os anticorpos que reconhecem os domínios DI/II têm maior potencial neutralizante que os que reconhecem DIII.

7. Perspectivas

7. Perspectivas

- ✓ Avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos neutralizantes anti-DI/II da proteína E, gerados após imunização com pE1D2, com outros sorotipos virais, em relação a atividade neutralizante e possível efeito de ADE;
- ✓ Avaliar os epítomos imunogênicos da proteína E envolvidos na ativação de células T efectoras em camundongos BALB/c imunizados com pE1D2, 7 dias após o desafio com DENV2 e correlacionar com a resposta de células T de memória;
- ✓ Caracterizar as subpopulações de células T envolvidas na proteção gerada pelo pE1D2 e responsivas aos peptídeos previamente selecionados;
- ✓ Avaliar a expressão *in vitro* da proteína recombinante DI/II em células de mamíferos transfectadas com o plasmídeo pE3D2;
- ✓ Confirmar os resultados obtidos com a vacina pE3D2 quanto a proteção e a imunogenicidade.

8. Referências

- Aguiar M, Stollenwerk N, Halstead SB. The Impact of the Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005179.
- 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; 30(5):837-45.
- Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res*. 2014; 181:53-60.
- ANVISA, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota informativa sobre a vacina da Dengue Sanofi.
- Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print
- Acesso em 13 de março de 2017, às 10:40 hrs
- 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.
- Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol*. 2011; 187(1):424-33.
- Azevedo AS, Gonçalves AJ, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AM. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One*. 2013; 8(3).

- 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.
- Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 2013; 3.
- Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra141.
- Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res*. 2013; 162(3):144-55.
- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, Wu SJ, Sun P, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG, Porter KR. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 2011; 29(5):960-8.
- 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; 496 (7446):504-7.
- Blaney JE JR, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol*. 2006; 19(1):10-32.
- Burattini MN, Lopez BF, Coutinho F, Siqueira JB Jr, Homsani S, Sarti S, Massad E. Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014. *Clinics*. 2016; 71(8): 455–463.
- Byk L, Gamarnik V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu Rev Virol*. 2016; 3(1): 263–281.
- Campos RK, Wong B, Xie X, Lu YF, Shi PY, Pompon J, Garcia-Blanco MA, Bradrick SS. RPLP1 and RPLP2 Are Essential Flavivirus Host Factors That Promote Early Viral Protein Accumulation. *J Virol*. 2017; 91(4).
- 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, Bouckenoghe A; 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;384(9951):1358-65.
- Carnec X, Meertens L, Dejarnac O, Perera-Lecoin M, Hafirassou ML, Kitaura J, Ramdasi R, Schwartz O, Amara A. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. *J Virol*. 2015; 14;90(1):92-102.
- Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(1):132-4.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol*. 1990; 44: 649-688.
- Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *N Y Acad Sci*. 2001; 951:272-85.
- Che P, Tang H, Li Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*. 2013; 446 303-13.
- Chen H, Zheng X, Wang R, Gao N, Sheng Z, Fan D, Feng K, Liao X, An J. Immunization with electroporation enhances the protective effect of a DNA vaccine candidate expressing prME antigen against dengue virus serotype 2 infection. *Clin Immunol*. 2016;171:41-49.
- Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, Luo YH, Wan SW, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol Immunol*. 2009; 47(2-3):398-406.
- Clyde K, Kile JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol*. 2006; 8 (23):11418–11431.
- Cockburn JJ, Navarro Sanchez ME, Goncalvez AP, Zaitseva E, Stura EA, Kikuti CM, Duquerroy S, Dussart P, Chernomordik LV, Lai CJ, Rey FA. Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. 2012; 1;31(3):767-79.
- Coconi-Linares N, Ortega-Dávila E, López-González M, García-Machorro J, García-Cordero J, Steinman RM, Cedillo-Barrón L, Gómez-Lim MA. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2013; 31(19):2366-71.

- Coelho GE, Buratini MN, Teixeira MDA G, Coutinho FA, Massad E. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(6):535-9.
- Coller BA, Clements DE. Dengue vaccines: progress and challenges. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(3):391-8.
- Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, Queiroz JL, Armôa GR, Freire MS, Alves AM. 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.* 2006; 24: 195-205.
- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. 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, Freire MS, Alves AM. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine.* 2006b; 24(21):4562-4.
- 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.
- Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol.* 2013; 182(6):1950-61.
- Danko JR, Kochel T, Teneza-Mora N, Luke TC, Raviprakash K, Sun P, Simmons M, Moon JE, de La Barrera R, Martinez LJ, Thomas SJ, Kenney RT, Smith L, Porter KR. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(3):849-856.
- Dans AL, Dansa LA, Lansanga MAD, Silvestreb MA, Gordon H. Controversy and debate on dengue vaccine series: paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. *Guyattc Journal of Clinical Epidemiology.* 2018; 95; 137-139.

- de Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, Messer WB, Huynh JP, Wahala WM, White LJ, Diamond MS, Baric RS, Crowe JE Jr, de Silva AM. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(19):7439-44.
- Deen J, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farra JJ. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006; 368:170–173.
- Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinski A, Jumnainsong A, Edwards C, Quyen NT, Duangchinda T, Grimes JM, Tsai WY, Lai CY, Wang WK, Malasit P, Farrar J, Simmons CP, Zhou ZH, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol*. 2015; 16(2):170-177.
- Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*. 2015; 162(3):488-92.
- Diaz C, Lin L, Martinez LJ, Eckels KH, Campos M, Jarman RG, De La Barrera R, Lepine E, Toussaint JF, Febo I, Innis BL, Thomas SJ, Schmidt AC. Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults from Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg*. 2018.
- Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, Tallat KR, Hynes NA, Wanionek K, Carmolli MP, Luke CJ, Murphy BR, Subbarao K, Whitehead SS. A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines safe and immunogenic in flavivirus-naïve adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis* 2013; 207:957–65.
- Durbin AP, KirkpatrickBD, 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.
- Fahimi H, Mohammadipour M, Haddad Kashani H, Parvini F, Sadeghizadeh M. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102(7):2977-2996.

- Fajardo-Sánchez E, Galiano V, Villalaín J. Spontaneous membrane insertion of a dengue virus NS2A peptide. *Arch Biochem Biophys*. 2017; 627:56-66.
- Falconar AK. 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*. 2007; 14(5): 493-504.
- Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol*. 1997; 142(5): 897-916.
- Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol*. 1989; 63(5):1852-60.
- Fares RC, Souza KP, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:321873.
- Fernandez S, Thomas SJ, De La Barrera R, Im-Erbsin R, Jarman RG, Baras B, Toussaint JF, Mossman S, Innis BL, Schmidt A, Malice MP, Festraets P, Warter L, Putnak JR, Eckels KH. An adjuvanted, tetravalent dengue virus purified inactivated vaccine candidate induces long-lasting and protective antibody responses against dengue challenge in rhesus macaques. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92(4):698-708.
- Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, de Alwis R, Ng TS, Kostyuchenko VA, Jadi RS, Kukkaro P, de Silva AM, Crowe JE, Lok SM. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. *Nat Commun*. 2015; 20; (6):6341.
- Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, de Alwis AR, Ng TS, Kostyuchenko VA, Ibarra KD, Wang J, Harris E, de Silva A, Crowe JE Jr, Lok SM. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol Med*. 2014; 6(3):358-71.

- Flipse J, Mayra A, Diosa-Toro, Tabitha E, Hoornweg, Denise P. I. van de Pol, Silvio Urcuqui-Inchima, Jolanda M. Smit. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses *Sci Rep*. 2016; 6: 29201.
- Freire JM, Santos NC, Veiga AS, Da Poian AT, Castanho MA. Rethinking the capsid proteins of enveloped viruses: multifunctionality from genome packaging to genome transfection. *FEBS J*. 2015; 282(12):2267-78.
- Fuchs J, Chu H, O'Day P, Pyles R, Bourne N, Das SC, Milligan GN, Barrett AD, Partidos CD, Osorio JE. Investigating the efficacy of monovalent and tetravalent dengue vaccine formulations against DENV-4 challenge in AG129 mice. *Vaccine*. 2014; 32(48):6537-43.
- Gack MU, Diamond MS. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. *Curr Opin Virol*. 2016; 20:119-128.
- Gao F, Duan X, Lu X, Liu Y, Zheng L, Ding Z, Li J. Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 391:952-957
- Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, Wilson JM. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther*. 2008; 19(9):927-36.
- Gelanew T, Hunsperger E. Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against the dengue virus-4 (DENV-4) non-structural protein (NS1). *Virol J*. 2018; 15(1):30.
- George SL, Wong MA, Dube TJ, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, Haller AA, Osorio JE, Eggemeyer LM, Irby-Moore S, Frey SE, Huang CY, Stinchcomb DT. Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naive Adults: A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial. *J Infect Dis*. 2015; 212(7):1032-41.
- Gil L, Lazo L, Valdés I, Suzarte E, Yen P, Ramírez R, Álvarez M, Dung LT, Cobas K, Marcos E, Pérez Y, Guzmán MG, D Hien N, Guillén G, Hermida L. The tetravalent formulation of domain III-capsid proteins recalls memory B- and T-cell responses induced in monkeys by an experimental dengue virus infection. *Clin Transl Immunology*. 2017; 6(6):e148.

- Gonçalves AJ, Oliveira ER, Costa SM, Paes MV, Silva JF, Azevedo AS, Mantuano-Barradas M, Nogueira AC, Almeida CJ, Alves AM. Cooperation between CD4+ T Cells and Humoral Immunity Is Critical for Protection against Dengue Using a DNA Vaccine Based on the NS1 Antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9;9(12):e0004277.
- Green AM, Harris E. Monocyte-plasmablast crosstalk during dengue. *Cell Host Microbe*. 2014; 16(1):7-9.
- Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol*. 2005; 2;2(1):1.
- Guo-Hong Li, Zhi-Jie Ning, Yi-Ming Liu, Xiao-Hong Li. Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 449.
- Guy B, Saville M, Lang J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin*. 2010; 6(9).
- Guzman MG & Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 385(9966):453-65.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(12):S7-16.
- Guzman MG¹, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013;158(7):1445-59.
- Hadinagoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Pallardy S, Noriega F, Bouckenoghe A. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med*. 2015; 373(13):1195-206.
- Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003; 60:421-67.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007; 370(9599):1644-52. Review.
- Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*. 2017; 35(47):6355-6358.

- Halstead SB. Licensed Dengue Vaccine: Public Health Conundrum and Scientific Challenge. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 95(4):741-745.
- Halstead SB. Safety issues from a Phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2018.
- Henchal EA & Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol. Rev.* 1990; 3(4):376-396.
- Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger CHLESINGER JJ. Synergistic interaction of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol.* 1988; 69: 2101-2107.
- Hertz T, Beatty PR, MacMillen Z, Killingbeck SS, Wang C, Harris E. Antibody Epitopes Identified in Critical Regions of Dengue Virus Nonstructural 1 Protein in Mouse Vaccination and Natural Human Infections. *J Immunol.* 2017; 198(10):4025-4035.
- Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology.* 2000; 32(5):1069-77.
- Huang SS, Li IH, Hong PD, Yeh MK. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:3161-9.
- Hurtado-Melgoza ML, Ramos-Ligonio A, Álvarez-Rodríguez LM, Meza-Menchaca T, López-Monteon A. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. *J Biomed Sci.* 2016; 23(1):85.
- Idris F, Muharram SH, Diah S. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. *Arch Virol.* 2016; 161(7):1751-60.
- Iglesias NG, Mondotte JA, Byk LA, de Maio FA, Samsa MM, Alvarez C, Gamarnik AV. Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. *Traffic.* 2015; 16(9):962-77.
- Jindadamrongwech S, Smith DR. Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells. *Intervirology.* 2004; 47:370-3.

- Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017; 358(6365):929-932.
- Kaufmann B, Vogt R, Goudsmit J, Holdaway HA, Aksyuk AA, Chipman PR, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(44): 18950–18955.
- Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germes*. 2013; 3(1):26-35.
- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology*. 2001; 44(2-3):176-97.
- Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, Hynes N, Diehl SA, Elwood D, Jarvis AP, Sabundayo BP, Lyon CE, Larsson CJ, Jo M, Lovchik JM, Luke CJ, Walsh MC, Fraser EA, Subbarao K, Whitehead SS. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *J Infect Dis*. 2015; 212(5):702-10.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, Hayes C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997; 15: 547-552.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, Phillips IA, Ewing DF, Murphy GS, Porter KR. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*; 2000; 18: 3166-73.
- Konishi E, Kosugi S, Imoto J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*. 2006; 15;24(12):2200-7.
- Kuczera D, Assolini JP, Tomiotto-Pellissier F, Pavanelli WR, Silveira GF. Highlights for Dengue Immunopathogenesis: Antibody-Dependent Enhancement, Cytokine Storm, and Beyond. *J Interferon Cytokine Res*. 2018; 38(2):69-80.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of

dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002; 108(5): 717-725.

Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48(2):222-9.

Lai YC, Chuang YC, Liu CC, Ho TS, Lin YS, Anderson R, Yeh TM. Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. *Sci Rep*. 2017; 7: 6975.

Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Denis AC, Martin JL, Whitehead SS, Fauci AS. Dengue Research opportunities in the Americas, *The journal of infectious diseases*. 2012; 206(7):1121-7.

Lee E, Weir RC, Dalgarno L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology*. 1997; 232(2):281-90.

Li J, Huang R, Liao W, Chen Z, Zhang S, Huang R. Dengue virus utilizes calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 418:622–627.

Li XQ, Qiu LW, Chen Y, Wen K, Cai JP, Chen J, Pan YX, Li J, Hu DM, Huang YF, Liu LD, Ding XX, Guo YH, Che XY. Dengue virus envelope domain III immunization elicits predominantly cross-reactive, poorly neutralizing antibodies localized to the AB loop: implications for dengue vaccine design. *J Gen Virol*. 2013; 94 (Pt 10):2191-201.

Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 2008; 319(5871):1830-4.

Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002; 186(8):1165-8.

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; 72(12):9729-37.
- Lin HE, Tsai WY, Liu IJ, Li PC, Liao MY, Tsai JJ, Wu YC, Lai CY, Lu CH, Huang JH, Chang GJ, Wu HC, Wang WK. Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(1):e1447.
- Lindebach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. *KNIFE K. M., HOWLEY, P. M. Fields Virology.* 2007; pp. 1101 – 1152.
- Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In Knipe KM, Howley PM (eds) *Fields Virology.* 2001; pp. 991 – 1041.
- Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 2011; 239(1):62-84.
- Lu H., Xu X. F., Gao N., Fan D. Y., 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; 54, 109–114.
- Lubick KJ, Robertson SJ, McNally KL, Freedman BA, Rasmussen AL, Taylor RT, Walts AD, Tsuruda S, Sakai M, Ishizuka M, Boer EF, Foster EC, Chiramel AI, Addison CB, Green R, Kastner DL, Katze MG, Holland SM, Forlino A, Freeman AF, Boehm M, Yoshii K, Best SM. Flavivirus Antagonism of Type I Interferon Signaling Reveals Prolidase as a Regulator of IFNAR1 Surface Expression. *Cell Host Microbe.* 2015; 18(1):61-74.
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(10):3414-9.
- Makhluf H, Shresta S. Development of Zika Virus Vaccines. *Vaccines (Basel).* 2018;18;6(1)
- Manoff SB, George SL, Bett AJ, Yelmene ML, Dhanasekaran G, Eggemeyer L, Sausser ML, Dubey SA, Casimiro DR, Clements DE, Martyak T, Pai V, Parks DE, Collier

- BA. Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine. *Vaccine*. 2015; 33(50):7126-34.
- Martina Be, Koraka P, Osterghus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4):564-81.
- Martina Be. Dengue pathogenesis: a disease driven by the host response. 2014; 97, (3);pp. 197-214(18).
- Martínez-Vega RA, Carrasquilla G, Luna E, Ramos-Castañeda J. ADE and dengue vaccination. *Vaccine*. 2017; 35(32):3910-3912.
- McBurney SP, Sunshine JE, Gabriel S, Huynh JP, Sutton WF, Fuller DH, Haigwood NL, Messer WB. Evaluation of protection induced by a dengue virus serotype 2 envelope domain III protein scaffold/DNA vaccine in non-human primates. *Vaccine*. 2016; 34(30):3500-7.
- McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem*. 2011; 286(25):22147-59.
- Mellado-Sánchez G, García-Machorro J, Sandoval-Montes C, Gutiérrez-Castañeda B, Rojo-Domínguez A, García-Cordero J, Santos-Argumedo L, Cedillo-Barrón L. A plasmid encoding parts of the dengue virus E and NS1 proteins induces an immune response in a mouse model. *Arch Virol*. 2010; 155(6):847-56.
- Meunier M, Chemaly M, Dory D. DNA vaccination of poultry: The current status in 2015. *Vaccine*. 2015; 15, 264-410.
- Miller N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther*. 2010; 12(1):31-8.
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*. 2007; 282(12):8873-82.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 6986-91.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004; 427(6972):313-9.

- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol.* 2005; 79(2):1223-31.
- 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. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003; 9(7):921-7.
- Montes-Gómez AE, Vivanco-Cid H, Bustos-Arriaga J, Zaidi MB, Garcia-Machorro J, Gutierrez-Castañeda B, Cedillo-Barron L. Construct and expression of recombinant domains I/II of dengue virus- 2 and its efficacy to evaluate immune response in endemic area: Possible use in prognosis. *Acta Trop.* 2017; 171:233-238.
- Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(8):e2357.
- Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A, Ramos C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine.* 2005; 23: 3469-76.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(1):13-22.
- Muller DA, Landsberg MJ, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B, Young P. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *Journal of General Virology.* 2012; 93, 771–779.
- Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology immunology role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013; 98:192-208.
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(24):14333-8.

- Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005; 79(13):8004-13.
- 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.
- Natarajan S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against denguevirus. *Genet Mol Biol*. 2010; 33(2):214-9.
- Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *J Virol*. 2009; 83(9):4338-44
- Nedjadi T, El-Kafrawy S, Sohrab SS, Desprès P, Damanhour G, Azhar E. Tackling dengue fever: Current status and challenges. *Virol J*. 2015; 12:212.
- Ngono EA, Chen HW, Tang WW, Joo Y, King K, Weiskopf D, Sidney J, Sette A, Shresta S. Protective Role of Cross-Reactive CD8 T Cells Against Dengue Virus Infection. *EBioMedicine*. 2016;13:284-293.
- Ngono & Shresta. Immune Response to Dengue and Zika. *Annual Review of Immunology* 2018; Vol. 36.
- Niyomrattanakit P, Winoyanu wattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J Virol*. 2004; 78(24):13708-16.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22(5):358-63.
- Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(3):255-6.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990; 85(2):253.

- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G Jr, Miagostovich MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(9):1376-81.
- Oliphant T, Nybakken GE, Engle M, Xu Q, Nelson CA, Sukupolvi-Petty S, Marri A, Lachmi BE, Olshevsky U, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virol.* 2006; 80(24):12149-59.
- Oliveira ER, Gonçalves AJ, Costa SM, Azevedo AS, Mantuano-Barradas M, Nogueira AC, Alves AM. Aspects of T Cell-Mediated Immunity Induced in Mice by a DNA Vaccine Based on the Dengue-NS1 Antigen after Challenge by the Intracerebral Route. *PLoS One.* 2016; 11(9):e0163240.
- Oliveira ERA, de Alencastro RB, Horta BAC. New insights into flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. *J Comput Aided Mol Des.* 2017; 31(11):1009-1019.
- Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983; 25(1):53-4.
- 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; 84(6):978-87.
- Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, Silengo S, Scott J, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, Arguello J, Beatty ME, Santangelo J, Gordon GS, Huang CY, Stinchcomb DT. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(9):830-8.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhao AT, Mota EM, Basilio-de-Oliveira CA, Schatzmayr OM, Alves AMB. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. Laboratory investigation. 2009; 89: 1140-1151.

- Pereira CA, Barata MM, Hoelz Mde P, Medeiros VN, Marincola Fde C, Costa Neto C, Marinho DP, Oliveira TV, Trigo AG, Medeiros TK. Economic evaluation of cases of dengue fever attributed to the disaster of 2011 in Nova Friburgo (State of Rio de Janeiro/Brazil). *Cien Saude Colet*. 2014; 19(9):3693-704.
- Piccini LE, Castilla V, Damonte EB. Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0140824.
- Pierson TC, Diamond MS. *Curr Opin Virol*. 2012; 2:168–175.
- Pless E, Gloria-Soria A, Evans BR, Kramer V, Bolling BG, Tabachnick WJ, Jeffrey RP. Multiple introductions of the dengue vector, *Aedes aegypti*, into California. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(8): e0005718.
- Poggianella M, Slon Campos JL, Chan KR, Tan HC, Bestagno M, Ooi EE, Burrone OR. Dengue E Protein Domain III-Based DNA Immunisation Induces Strong Antibody Responses to All Four Viral Serotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(7):e0003947.
- Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Palacios R, Ho PL, Kalil J. Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect Dis*. 2018.
- Portal da Saúde. SUS. (Sistema Único de Saúde).
Disponível em:
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/06/2018-008-Publicacao.pdf>
Acesso em: 18 de março de 2018, às 22:15 hrs.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol*. 1998; 143: 997-1003.
- Potisopon S, Priet S, Collet A, Decroly E, Canard B, Selisko B. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42(18):11642–11656.
- 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; 9(4):e83386.

- Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005738.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis.* 1996; 174(6):1176-84.
- Putnak R, Fuller J, Vanderzanden L, Innis BL, Vaughn DW. Vaccination of Rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 469-476.
- Qi R, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008; 40(2): 91–101.
- Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hular I, Xiang AP, Ren B, Lahn BT. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10611.
- Quinan BR, Flesch IE, Pinho, Tânia M. G.; Coelho, Fabiana M.; Tschärke, David C.; da Fonseca, Flávio G. An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8+ T cells and antibody when expressed from modified vaccinia Ankara. *Vaccine.* 2014; 10;1016.
- Ramos-Castañeda J, Santos FB, Martínez-Vega R, Araujo JMG, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(1): e0005224.
- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology.* 2016; 29;13:131.
- Rather IA, Parray HA, Lone JB, Paek WK, Lim J, Bajpai VK, Park YH. Prevention and Control Strategies to Counter Dengue Virus Infection *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 336.
- 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; 353(1):166-73.
- Raviprakash K, Luke T, Doukas J, Danko J, Porter K, Burgess T, Kochel T. A dengue DNA vaccine formulated with Vaxfectin is well tolerated, and elicits

- strong neutralizing antibody responses to all four dengue serotypes in New Zealand white rabbits. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8(12):1764-8.
- Rey FA, Stiasny K, Vaney MC, Dellarole M, Heinz FX. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* 2018; 19(2):206-224.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005; 79(8):4557-67.
- Rigau-Perez J. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infectious Diseases.* 2006; 6:297–302.
- Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, Teo GH, Gan VC, Lye DC, Leo YS, Hanson BJ, Smith KG, Bertoletti A, Kemeny DM, MacAry PA. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in denguevirus infection. *J Virol.* 2013;87(5):2693-706.
- Rocha RP, Livonesi MC, Fumagalli MJ, Rodrigues NF, da Costa LC, Dos Santos MC, de Oliveira Rocha ES, Kroon EG, Malaquias LC, Coelho LF. Evaluation of tetravalent and conserved synthetic peptides vaccines derived from Dengue virus Envelope domain I and II. *Virus Res.* 2014; 188:122-7.
- Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Science.* 2010; 67(16): 2773-2786.
- Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings Da. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(1): 935.
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology.* 1998; 246: 317-28.
- Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123-32.
- Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med.* 2010; 30(1):149-60.
- Roth C, Delgado FG, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A. Immune Responses to Dengue and Zika Viruses-Guidance for T Cell Vaccine Development. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(2).

- Rothman AL, Kurane I, Ennis FA. Multiple specificities in the murine CD4+ and CD8+ T-cell response to dengue virus. *J Virol.* 1996; 70(10):6540-6.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(8):532-43.
- Russell PK, Halstead SB. Challenges to the Design of Clinical Trials for Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(8):e0004854.
- Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2012; 11(2):189-209.
- Sabchareon A, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Margolis HS, Letson GW. Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. I. Epidemiology of symptomatic acute dengue infection in children, 2006-2009. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(7):e1732.
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, Guzmán MG. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(1):128-35.
- Savidis G, McDougall WM, Meraner P, Perreira JM, Portmann JM, Trincucci G, John SP, Aker AM, Renzette N, Robbins DR, Guo Z, Green S, Kowalik TF, Brass AL. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep.* 2016; 16: 232–246.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81:245–246.
- Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, Michael SF, Robinson JE. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virology.* 2010; 7:28.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 1987; 68 (Pt 3):853-7.

- Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology*. 1993; 192(1):132-41.
- Schmidt AC, Lin L, Martinez LJ, Ruck RC, Eckels KH, Collard A, De La Barrera R, Paolino KM, Toussaint JF, Lepine E, Innis BL, Jarman RG, Thomas SJ. Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 96(6):1325-1337.
- Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM JR. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*. 2015; 33(29):3293-8.
- 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 B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, O'Brien KM, Nelson CA, Johnson S, Fremont DH, Diamond MS. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4):e1000823.
- 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.
- Srivichayakul C, Barranco-Santana EA, Esquilin-Rivera I, Oh HM, Raanan M, Sariol CA, Shek LP, Simasathien S, Smith MK, Velez ID, Wallace D, Gordon GS, Stinchcomb DT. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Healthy Children and Adults in Dengue-Endemic Regions: A Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Study. *J Infect Dis*. 2016; 213(10):1562-72.
- Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med*. 2003; 138(7):550-9.
- Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006; 87(10):2755-66.
- Stiasny K, Heinz FX. Flaviviruses and flavivirus. *Vaccines*. 2012; 30(29): 4301 – 4306.

- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ, Roehrig JT, Gromowski GD, Barrett AD, Fremont DH, Diamond MS. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol.* 2007; 81(23):12816-26.
- Suzuki R, Winkelmann ER, Mason PW. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J Virol.* 2009; 83(4):1870-80.
- Swarbrick MDC, Basavannacharya C, Chan KWK, Chan S, Singh D, Wei N Wint Wint Phoo WW, Luo D, Lescar J, Vasudevan SG. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic Acids Research*, 2017; 45, (22);12904–12920.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 197: 823–9.
- Teixeira MG, Siqueira JB JR, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(12):e2520.
- Teixeira MG, Barreto ML. Diagnosis and management of dengue. *BMJ.* 2009; 18;339:b4338.
- Thepparit C, Khakpoor A, Khongwichit S, Wikan N, Fongsaran C, Chingsuwanrote P, Panraksa P, Smith DR. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways os cell death. *BMC research notes.* 2013; 6(372): 1-14.
- Thepparit CC, Smith DR. Serotype-Specific Entry of Dengue Virus into Liver Cells: Identification of the 37-Kilodalton/67-Kilodalton High-Affinity Laminin Receptor as a Dengue Virus Serotype 1 Receptor. *J. Virol.* 2004; 78(22):12647-56.
- Thepparit C, Khakpoor A, Khongwichit S, Wikan N, Fongsaran C, Chingsuwanrote P, Panraksa P, Smith DR. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes.* 2013; 6:372.

- Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Hum Vaccin Immunother.* 2017; 13(5):1059-1072.
- 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.
- Unnikrishnan R, Faizal BP, Vijayakumar P, Paul G, Sharma RN. Clinical and laboratory profile of dengue in the elderly. *J Family Med Prim Care.* 2015; 4(3): 369–372.
- Versiani AF, Astigarraga RG, Rocha ES, Barboza AP, Kroon EG, Rachid MA, Souza DG, Ladeira LO, Barbosa-Stancioli EF, Jorio A, Da Fonseca FG. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. *J Nanobiotechnology.* 2017; 15(1):26.
- Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramírez JO, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Miranda Montoya MC, Cortés Supelano M, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tornieporth N, Saville M, Noriega F; CYD15 Study Group. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 2015; 372(2):113-23.
- Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, Roggendorf M, Roggendorf H, Allwinn R, Heinz FX. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathog.* 2013; 9(6):e1003458.
- Wahala WM, Huang C, Butrapet S, White LJ, de Silva AM. Recombinant dengue type 2 viruses with altered E protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera. *J. Virol.* 2012; 86 (7):4019.
- Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology.* 2009; 392(1):103-13.
- Wahren B; Liu MA. DNA Vaccines: Recent Developments and the Future. *Vaccines (Basel).* 2014; 2(4): 785–796.

- Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *Formos Med Assoc.* 2013; 112(1): 3-11.
- Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R, Liu HS, Yeh TM, Yen YT, Wu-Hsieh BA, Lin YS. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One.* 2014; 9(3):e92495.
- Wan SW, Chen PW, Chen CY, Lai YC, Chu YT, Hung CY, Lee H, Wu HF, Chuang YC, Lin J, Chang CP, Wang S, Liu CC, Ho TS, Lin CF, Lee CK, Wu-Hsieh BA, Anderson R, Yeh TM, Lin YS. Therapeutic Effects of Monoclonal Antibody against Dengue Virus NS1 in a STAT1 Knockout Mouse Model of Dengue Infection. *J Immunol.* 2017; 199(8):2834-2844.
- Wei J, Chen H, An J. Recent progress in dengue vaccine development. *Viol Sin.* 2014;29(6):353-63.
- Weiner DB, Kennedy RC. Genetic vaccines. *Sci Am.* 1999; 281(1):50-7.
- Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, Broadwater A, Kolla RV, De Silva AD, de Silva AM, Mattia KA, Doranz BJ, Grey HM, Shresta S, Peters B, Sette A. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(22):E2046-53.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 518-28.
- Widman DG, Baric RS. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge: a key target for dengue virus vaccine design? *Expert Rev Vaccines.* 2015; 14(1):5-8.
- Williams JÁ. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production *Vaccines.* 2013; 1, 225-249.
- Williams KL; Wahala, WM; Wahala SO; Silva AM; Harris E. Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology.* 2012; 429(1):12-20.
- Woonsung N, Minjoo Y, Il-K, Heejun Y, and Daesub S. Animal models for dengue vaccine development and testing. *Clin Exp Vaccine Res.* 2017; 6(2): 104–110.

- World Health Organization. 2009 Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization. 2012. Global Strategy For Dengue Prevention And Control. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>.
Acesso em: 12 de fevereiro de 2018, às 17:45h.
- World Health Organization. 2016. Dengue vaccine: WHO position paper. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1>
Acesso em: 12 de fevereiro de 2018, às 18:32h.
- World Health Organization. 2016 Global Burden of Dengue Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>.
Acesso em: 12 de fevereiro de 2018, às 19:13h.
- 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; 21(25-26): 3919-29.
- Xie X, Gayen S, Kang CB, Yuan Z, Shib P. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*. 2013; 4609 – 4622.
- Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, Sette A, Shresta S. 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*. 2010; 185: 5405–16.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzymelinked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(3): 1053-1057.
- Yung C, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JGX, Lye DC, Ng LC, Leo YS. Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92(5): 999–1005.

- Zellweger RM, Tang WW, Eddy WE, King K, Sanchez MC, Shresta S. CD8+ T Cells Can Mediate Short-Term Protection against Heterotypic Dengue Virus Reinfection in Mice. *J Virol.* 2015; 89(12):6494-505.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 2003; 10(11):907-12.
- Zhang S, Liang M, Gu W, Li C, Miao F, Wang X, Jin C, Zhang L, Zhang F, Zhang Q, Jiang L, Li M, Li D. *Virol J.* Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice. 2011; 30;8:333.
- Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J.M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S., Zhou, Z.H. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2012; **20**: 105-110
- Zheng A, Yuan F, Kleinfelter LM, Kielian M. A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. *Nature Communications.* 2014; 5: 3877.
- 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; 29(4):763-71.
- Zheng X, Chen H, Wang R, Fan D, Feng K, Gao N, An J. Effective Protection Induced by a Monovalent DNA Vaccine against Dengue Virus (DV) Serotype 1 and a Bivalent DNA Vaccine against DV1 and DV2 in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 12;7:175.
- Zompi S, Santich BH, Beatty PR, Harris E. Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. *J Immunol.* 2012; 188(1):404-16.